

Strukturelle und funktionelle Untersuchung des lysosomalen integralen Membranproteins LIMP-2

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
**der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität**
zu Kiel

Vorgelegt von Herrn Johann Groth

Institut für Biochemie
Kiel, April 2012

Referent/in: Herr Prof. Dr. Paul Saftig
Korreferent/in: Herr Prof. Dr. Axel Scheidig
Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2012
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 29.05.2012
gez. Herr Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Das spät endosomale / lysosomale Kompartiment	9
1.2	Lösliche Hydrolasen und lysosomale Membranproteine	10
1.3	Lysosomale Erkrankungen	12
1.4	Lysosomale Biogenese	13
1.4.1	M6P-Rezeptor abhängiger Transportweg	14
1.4.2	M6P-Rezeptor unabhängiger Transportweg	14
1.4.3	Der β -Glucocerebrosidase Weg	16
1.5	Der β -Glucocerebrosidase Rezeptor LIMP-2	18
1.6	Die Interaktion zwischen β -GC und LIMP2	21
1.7	AMRF Mutanten und die Bedeutung verkürzter LIMP-2 Formen	22
2	Fragestellung	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Geräte	25
3.1.1	Verbrauchsmaterialien	28
3.1.2	Chemikalien und Enzyme	28
3.1.3	Verwendete Kits	30
3.1.4	Fertiggele	31
3.1.5	Software	31
3.1.6	Online-Tools	31
3.1.7	Plasmide und Vektoren	31
3.1.7.1	Allgemeine Plasmide	33
3.1.7.2	Glykosylierungsmutanten	33
3.1.7.3	Methioninmutanten	34
3.1.7.4	Cysteinmutanten	34
3.1.8	Primer	35
3.1.8.1	Sequenzierprimer	35
3.1.8.2	Klonierungsprimer	36
3.1.8.2.1	Allgemeine Primer	36
3.1.8.2.2	Cysteinmutanten	36
3.1.8.2.3	Methioninmutanten	36

Inhaltsverzeichnis

3.1.8.2.4 Glykosylierungsmutanten.....	37
3.1.9 Synthetische LIMP-2 Peptide	39
3.1.10 Zelllinien	40
3.1.11 Antikörper	41
3.1.11.1 Primäre Antikörper	41
3.1.11.2 Sekundäre Antikörper	42
3.1.12 Puffer.....	42
3.1.12.1 Allgemeine Puffer.....	42
3.1.12.2 Crosslink Puffer	44
3.1.12.3 Deglykosylierungs-Puffer	44
3.1.12.4 Enzymassay Puffer	45
3.1.12.5 Immunfluoreszenz Puffer	45
3.1.12.6 NMR-Puffer.....	46
3.1.12.7 SDS-PAGE und <i>Western-Blot</i> Puffer	46
3.1.13 Zellkulturmedium.....	47
3.1.14 Bakterienstämme.....	47
3.2 Methoden	48
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	48
3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion	48
3.2.1.1.1 Standard-PCR.....	48
3.2.1.1.2 Fusions-PCR	49
3.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	50
3.2.1.3 Reinigung von cDNA aus Agarosegelen.....	50
3.2.1.4 Restriktionsverdau	50
3.2.1.5 Dephosphorylierung	51
3.2.1.6 Ligation.....	51
3.2.1.7 Herstellung elektrokompenter Bakterien	52
3.2.1.8 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen.....	53
3.2.1.9 Plasmidamplifikation und -reinigung	54
3.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von DNA	54
3.2.1.11 Sequenzierung	55
3.2.2 Zellbiologische Methoden.....	56
3.2.2.1 Zellkultur	56
3.2.2.2 Passagieren von adhärenen Zellen.....	56

Inhaltsverzeichnis

3.2.2.3	Kryokonservierung von Zellen	56
3.2.2.4	Revitalisierung von Zellen.....	57
3.2.2.5	Transiente Transfektion von Zellen.....	57
3.2.2.6	siRNA <i>Knockdown</i> von β -Glucocerebrosidase Hela-Zellen	58
3.2.2.7	Pelletierung von Zellen.....	59
3.2.2.8	Isolierung und Gewinnung von Lysaten aus Zellkulturzellen.....	60
3.2.2.9	Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen und deren mikroskopische Auswertung	60
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	62
3.2.3.1	Rekonstitution von Proteinen.	62
3.2.3.2	Proteinbestimmung mittels BCA und UV ₂₈₀ Messung.....	63
3.2.3.3	Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie	64
3.2.3.4	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) -Spektroskopie	66
3.2.3.5	Präzipitation rekombinanter β -Glucocerebrosidase.....	67
3.2.3.6	Rekombinante Expression von Proteinen in HEK293-6E Zellen	68
3.2.3.7	Affinitätschromatographie.....	70
3.2.3.8	Größenausschlusschromatographie	71
3.2.3.9	Massenspektroskopische Untersuchungen	72
3.2.3.10	Deglykosylierung von Proteinen	72
3.2.3.10.1	Allgemeine Beschreibung	72
3.2.3.10.2	Deglykosylierung durch PNGaseF.....	73
3.2.3.10.3	Deglykosylierung durch EndoH.....	74
3.2.3.11	Fällung von Proteinen mittels TCA.....	75
3.2.3.12	Immunpräzipitation (IP) und Ko-Immunpräzipitation (CoIP) von Proteinen aus Zell-Lysaten	76
3.2.3.13	Quervernetzung (<i>Crosslink</i>) von Proteinen	77
3.2.3.13.1	Intrazellulärer <i>Crosslink</i> von Proteinen mit DSS.....	78
3.2.3.13.2	<i>Crosslink</i> in gereinigten Proteinlysaten mit BS ³	79
3.2.3.13.3	Direkter <i>Crosslink</i> in der lebenden Zelle mittels Photo-Aminosäure Derivaten	80
3.2.3.14	Western-Blot Analyse	81
3.2.3.14.1	SDS-, Tris-Acetat- und Bis-Tris-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE und NuPAGE).....	81
3.2.3.14.2	Transfer von aufgetrennten Proteinen auf Membranen.....	83
3.2.3.14.3	Immundetektion der transferierten Proteine.....	84

Inhaltsverzeichnis

3.2.3.15	Coomassie Färbung von PAGE-Gelen	85
3.2.3.16	Aktivitätsbestimmung von β -Glucocerebrosidase	85
4	Ergebnisse	87
4.1	Analyse der Glykosylierungsstellen innerhalb der luminalen Domäne von LIMP-2 ..	87
4.1.1	Der Einzel-Glykosylierungsstellen-Ansatz	89
4.1.1.1	PNGaseF und <i>Western-Blot</i> Ergebnisse	89
4.1.1.2	LIMP-2 Varianten mit nur einer Glykosylierungsstelle sind nicht lysosomal lokalisiert	91
4.1.2	Der Einzel-Austausch-Ansatz	92
4.1.2.1	PNGaseF und <i>Western-Blot</i> Ergebnisse: Neun von elf potentiellen N- Glykosylierungsstellen werden genutzt	92
4.1.2.2	Die herausragende Rolle der Glykosylierung des Asparaginrestes N68 von LIMP-2	93
4.1.3	LIMP-2 weist eine partielle EndoH Sensitivität auf	96
4.1.4	Identifikation der EndoH resistenten und sensitiven N-Glykosylierungsstellen von LIMP-2	96
4.1.5	Die nicht konservierte N-Glykosylierungsstelle N122 wird nicht genutzt	100
4.1.6	Auswirkungen der AMRF hervorruhenden Punktmutation H363N	102
4.1.7	Die partielle EndoH Sensitivität von LIMP-2 beruht nicht auf der Interaktion zwischen LIMP-2 und β -GC	103
4.2	Untersuchungen einer möglichen Dimerisierung von LIMP-2	106
4.2.1	LIMP-2 Dimerbildung durch <i>Crosslink</i> mit Photo-Aminosäuren	107
4.2.2	Ein LIMP-2 / β -GC Komplex lässt sich nicht über Photo-Aminosäuren stabilisieren	109
4.2.3	Eine Eingrenzung der Dimerisierungsdomäne von LIMP-2 ist über den Photo- Aminosäuren Ansatz nicht möglich	110
4.2.4	Das Bandenmuster im <i>Western-Blot</i> nach <i>Crosslink</i> über Photo-Aminosäuren und unter nicht reduzierenden Bedingungen ist für LIMP-2 identisch	111
4.2.5	Untersuchungen des Einflusses luminaler Cysteine hinsichtlich einer LIMP-2 Dimerisierung	113
4.2.6	Intrazellulärer <i>Crosslink</i> von LIMP-2 und β -GC durch DSS in murinen embryonalen Fibroblasten	115
4.3	Vorbereitende Experimente zur Strukturaufklärung der luminalen Domäne von LIMP-2 und Einsicht in die Stöchiometrie des LIMP-2 / β -GC Komplexes	117
4.3.1	Rekombinante Produktion der luminalen LIMP-2 Domäne im prokaryontischen Expressionssystem	117

Inhaltsverzeichnis

4.3.2	Rekombinante Produktion der luminalen LIMP-2 Domäne im eukaryontischen Expressionssystem	118
4.3.2.1	Die Expression der luminalen LIMP-2 Domäne führt zur Ko-Sekretion endogener β -GC	119
4.3.2.2	Größenausschlusschromatographie des NiNTA gereinigten Zellkulturüberstandes	120
4.3.2.3	Analyse der SEC Subpopulationen und <i>Crosslink</i> mittels BS ³	122
4.3.3	Ko-Expression der luminalen LIMP-2 Domäne zusammen mit β -GC.....	124
4.3.3.1	SEC des NiNTA gereinigten Zellkulturüberstandes und die Analyse der Fraktionen.....	124
4.4	Analyse synthetischer LIMP-2 Peptide	127
4.4.1	Analyse der Sekundärstruktur von LIMP-2_L152-V173 mittels CD-Spektroskopie.....	127
4.4.2	Analyse der Tertiärstruktur von LIMP-2_L152-V173 mittels NMR-Spektroskopie	128
4.4.3	Analyse des LIMP-2_L152-V173 Peptids mittels SEC.....	129
4.4.4	Analyse der Sekundärstruktur eines Biotin gelabelten LIMP-2 Peptides mittels CD-Spektroskopie.....	130
4.4.5	Analyse des mit Biotin gelabelten LIMP-2 Peptides mittels SEC.....	130
4.4.6	Das biotinylierte LIMP-2 <i>coiled-coil</i> Peptid bindet spezifisch rekombinante β -GC.....	131
4.4.7	Die Interaktion mit dem biotinylierte LIMP-2 <i>coiled-coil</i> Peptid führt zu einer erhöhten Enzymaktivität der rekombinanten β -GC	134
5	Diskussion	136
5.1	Der Glykosylierungsstatus von LIMP-2 und sein Einfluss auf das Protein	136
5.1.1	Bedeutung der Glykosylierung als ko-/posttranslationale Modifikation von Proteinen	136
5.1.2	Identifizierung der im murinen LIMP-2 Protein genutzten N-Glykosylierungsstellen.....	137
5.1.3	Die herausragende Rolle der Glykosylierung von N68.....	138
5.1.4	Die Auswirkung der zusätzlichen potentiellen N-Glykosylierungsstelle H363N auf das humane LIMP-2 Protein	140
5.1.5	N-Glykosylierung von LIMP-2 und die Faltung des Proteins	140
5.1.6	Partielle EndoH Sensitivität	141
5.2	Untersuchung zur LIMP-2 Dimerisierung.....	143
5.2.1	Eine LIMP-2 Dimerisierung über Disulfidbrücken ist artifizieller Natur.....	144
5.2.2	Homologe LIMP-2 Verknüpfung mit DSS	146

Inhaltsverzeichnis

5.3	Rekombinante Expression der luminalen LIMP-2 Domäne	147
5.4	Die LIMP-2 <i>coiled-coil</i> Domäne als synthetisches Peptid.....	151
6	Zusammenfassung	153
7	Summary	154
8	Literaturverzeichnis	155
9	Anhang	169
9.1	Abbildungsverzeichnis	169
9.2	Abkürzungen	171
9.3	Lebenslauf	174
9.4	Publikationen und Poster	175
9.5	Danksagung	176
9.6	Erklärung	177

1 Einleitung

1.1 Das spät endosomale / lysosomale Kompartiment

Lysosomen stellen in Eukaryonten die letzte Station im endozytotischen wie auch im autophagozytotischen bzw. phagozytotischen Abbauweg dar (de Duve, 1983 und 2005). Strukturell handelt es sich bei den bis auf in Erythrozyten ubiquitär vorkommenden Lysosomen um membranumhüllte Zellorganellen mit heterogenem Erscheinungsbild. Meistens bilden sich aber Vesikel mit einem mittlerem Durchmesser von unter 1 µm aus (Luzio et al., 2003; Lüllmann-Rauch, 2005). Vom Zytoplasma abgetrennt sind sie durch eine einfache cholesterinreiche Membran mit einem hohen Anteil an Glykoproteinen (Bleistein et al., 1980; Lloyd and Forster, 1986). Charakteristisch für Lysosomen ist, neben dem niedrigen luminalen pH-Wert von ungefähr fünf, das Fehlen von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) und rezyklisierenden Plasmamembran-Rezeptoren. Dadurch lassen sie sich teilweise von ihren Vorstufen, den frühen und späten Endosomen, unterscheiden.

Das Lysosom ist vor allem ein kataboles Kompartiment, und stellt durch den Abbau aller wichtigen Gruppen von intra- und extrazellulären Makromolekülen in ihre Grundbausteine dem Zellmetabolismus die entsprechenden Edukte wie Aminosäuren oder Zucker zur Verfügung. Auch in der Regulation des Gesamtproteinumsatzes der Zelle sowie der Zelloberflächenrezeptoren ist das lysosomale Kompartiment involviert (Eskelinen et al., 2003). Darüber hinaus ergeben sich aber noch weitere funktionale Bedeutungen (siehe Abbildung 1.1-1), zum Beispiel beim Abtöten bzw. Inaktivieren von phagozytierten Mikroorganismen, der Cholesterin Homöostase (Saftig and Klumperman, 2009.) sowie im Rahmen des programmierten Zelltodes mit der Freisetzung von Cathepsinen (Jäättelä, 2004) und der Reparatur der Zellplasmamembran durch Exozytose (Reddy et al., 2001).

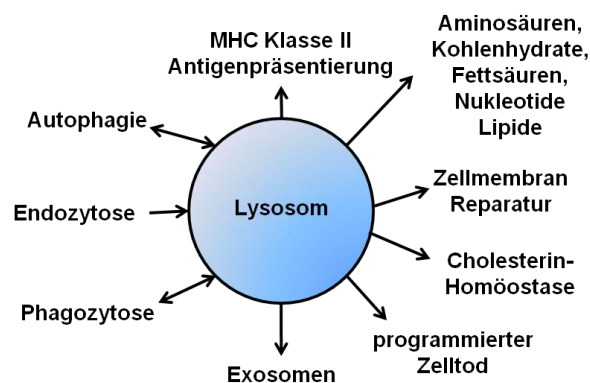


Abbildung 1.1-1: Schematische Darstellung der mit dem lysosomalen Kompartiment verknüpften Funktionen und Prozesse.

Neben den klassischen Lysosomen gibt es aber auch noch Lysosom-ähnliche Organellen (LRO), die spezialisierte zelltypspezifische Funktionen übernehmen, wie Melanosomen in

Melanozyten (Raposo and Marks, 2007) oder lytische Granula in zelltoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (Griffiths and Argon, 1995). Das MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Klasse-II-Komplex Kompartiment in antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen sei als ein weiteres Beispiel für ein LRO genannt (Saftig and Klumperman, 2009; Dell'Angelica et al., 2000). Für die Erfüllung der lysosomalen Funktion sind dabei vor allem zwei Proteinklassen entscheidend, die löslichen lysosomalen sauren Hydrolasen und die lysosomalen Membranproteine.

1.2 Lösliche Hydrolasen und lysosomale Membranproteine

Die sauren Hydrolasen sind die verantwortlichen Enzyme für die im Lumen der Lysosomen stattfindende Degradation der verschiedenen aufgenommenen Makromoleküle. Die momentan etwa 50 bekannten substratspezifischen Hydrolasen gehören dabei unterschiedlichen Klassen wie Phosphatasen, Nukleasen, Lipasen, Lipid-Esterasen, Glykosidasen und Proteasen wie den Cathepsinen an (Journet et al., 2002). Erst ihr perfektes Zusammenspiel und die einwandfreie Abfolge aller einzelnen Abbaureaktionen gewährleistet die reibungslose Funktion des lysosomalen Kompartimentes. Eine Gemeinsamkeit aller lysosomaler Enzyme ist ihr im sauren pH-Wert Bereich von 4,5 bis 5 liegendes Aktivitätsoptimum (Bond and Butler, 1987). Dies dient auch dem Schutz der Zelle und ihrer Umgebung, da fälschlich sezernierte oder bei Zellschädigung freigesetzte Hydrolasen unter physiologischen pH-Wert Bedingungen nicht oder nur verringert enzymatisch aktiv sind. Die notwendige Azidifizierung endo- und lysosomaler Kompartimente erfolgt ATP-abhängig durch eine membranständige Protonenpumpe (*V-type H⁺-ATPase*) (Forgac 2007).

Die lysosomalen Membranproteine sind die zweite große lysosomale Proteinklasse. In der Regel handelt es sich bei den etwa 120 (Schröder et al., 2007) lysosomalen Membranproteinen um hochglykosylierte Transmembranproteine (Bräulke and Bonifacio, 2008), von denen in letzter Zeit immer mehr mit Hilfe von Proteomstudien identifiziert werden konnten (Lübke et al., 2009; Schröder et al., 2007). Unter ihnen sind die verschiedenen lysosomal assoziierten und integralen Membranproteine (LAMPs und LIMPs) mengenmäßig am häufigsten vertreten.

Innerhalb des Lysosoms übernehmen die lysosomalen Membranproteine mannigfaltige Aufgaben und Funktionen (siehe Abbildung 1.2-1). Mit ihrer luminalen Zuckerglykokalix schützen sie zum einen sich selbst zum anderen aber auch die lysosomale Membran vor Degradation durch die sauren Hydrolasen und dienen somit der Aufrechterhaltung der Integrität des späten endosomalen / lysosomalen Kompartimentes (Kundra and Kornfeld, 1999). Bei der Biogenese und Reifung des Lysosoms spielen die Membranproteine und hier

vor allem die V-ATPase (s.o.) ebenso eine wichtige Rolle wie bei der Verschmelzung der Lysosomen mit anderen Vesikeln und der Plasmamembran (Eskelinen et al., 2003). Auch Rezeptorfunktionen werden von Membranproteinen übernommen, so ist das Membranprotein LIMP-2 für den lysosomalen Transport der löslichen sauren Hydrolase β -Glucocerebrosidase (β -GC) verantwortlich (Reczek et al., 2007). Membranproteine mit einer Transport- oder Kanalfunktion wiederum schleusen sowohl Abbauprodukte ins Zytoplasma, wie etwa Sialin die freien Sialinsäuren (Renlund et al., 1986), als auch abzubauen Substrate ins Lumen der Lysosomen, wie etwa der lysosomale Polypeptid Transporter TAPL (*transporter associated with antigen processing-like*) (Bangert et al., 2011). Eine weitere Importfunktion ist für LAMP-2a, einer Spleißvariante des lysosomal assoziierten Membranproteins 2 (LAMP-2), im Zuge der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA, *chaperone mediated autophagy*) beschrieben, bei der unter Hungerbedingungen oder aufgrund anderer Stressfaktoren beschädigte zytosolische Proteine mit einer bestimmten Erkennungssequenz (KFERQ) zur Degradation ins Lysosom transloziert werden (Cuervo and Dice, 1996; Bejarano and Cuervo 2010).

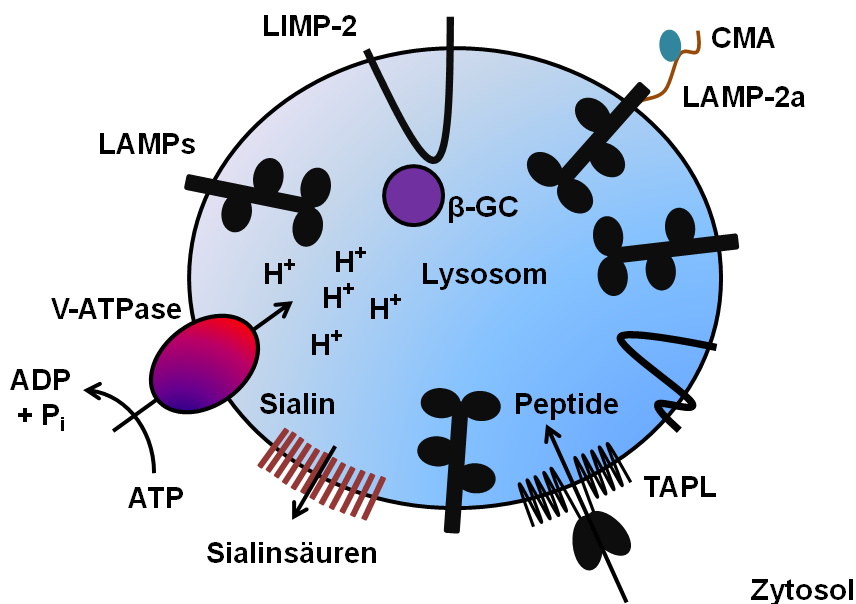


Abbildung 1.2-1: Ausgewählte Funktionen lysosomaler Membranproteine.

Neben der Azidifizierung des lysosomalen Kompartimentes unter Energieverbrauch durch die V-ATPase wird durch die lysosomalen Membranproteine der Im- und Export über die lysosomale Membran hinweg bewerkstelligt, zum Beispiel wie im Falle von LAMP-2a bei der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA). Aber auch als Transportrezeptor für lysosomale Hydrolasen fungieren einige Membranproteine. So wird β -Glucocerebrosidase (β -GC) über LIMP-2 ins Lysosom dirigiert. Auf die Darstellung der Glykosylierungen der einzelnen Proteine wurde aus Übersichtsgründen verzichtet. Nicht maßstabsgetreue Abbildung schematisch nach Eskelinen *et al.*, 2003.

1.3 Lysosomale Erkrankungen

Mutationen oder das Fehlen bestimmter lysosomaler Enzyme können zu lysosomalen Speichererkrankungen führen. Bei diesen etwa 40 unterschiedlichen Stoffwechselerkrankungen kommt es innerhalb des lysosomalen Kompartimentes im Allgemeinen zu Substratakkumulationen, welche sich dann durch weitere sekundäre zelluläre Fehlfunktionen und in pathophysiologischen Symptome wie u.a. Organvergrößerungen, neurologischen Dysfunktionen und skelettalen Dysmorphien äußern (Parkinson-Lawrence et al., 2010; Futerman and van der Meer, 2004). Neben den mit Hydrolasen assoziierten Speichererkrankungen treten auch nicht enzymatisch bedingte Erkrankungen auf. Diese sind zum Beispiel an bestimmte lysosomale Membranproteine gekoppelt (Ruivo et al., 2008; Vellodi, 2005).

So können aufgrund von Fehlfunktionen entsprechender Transportproteine und -kanäle beim Export der Abbauprodukte ins Zytosol Störungen auftreten. Infolgedessen kommt es dann zur Akkumulation von nicht degradiertem Material im lysosomalen Lumen, wie zum Beispiel bei der Cystinose (Town et al., 1998; Kalatzis et al., 2001), der Niemann-Pick-Krankheit Typ C1 (Vanier and Millat, 2003) oder der Sialinsäure-Speicherkrankheit bzw. Salla-Erkrankung (Aula and Gahl, 2001).

Weitere lysosomale Speichererkrankungen basieren auf dem sekundären Effekt, dass lysosomale Membranproteine bedingt durch einen fehlerhaften lysosomalen bzw. sekretorischen Sortierungs- und Transportweg erst gar nicht das lysosomale Kompartiment erreichen. So kommt es beim Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2 durch Mutation im für den Transport wichtigen zytosolischen Adapterprotein AP-3 zur Fehlsortierung und Plasmamembranlokalisation von lysosomal assoziierten Membranproteinen (Peden et al., 2004; Dell'Angelica et al., 1999).

Als eine weitere lysosomale Erkrankung sei darüber hinaus die Danon Erkrankung (Danon et al., 1981; Malicdan et al., 2008), die auf Mutationen im lysosomalen Membranprotein LAMP-2 zurückzuführen ist, genannt (Nishino et al., 2000). Es handelt sich dabei aber nicht um eine lysosomale Speichererkrankung im klassischen Sinne. Vielmehr kann es bedingt durch eine erniedrigte Motalität der Lysosomen und deren Fusionsrate mit anderen zellulären Strukturen zur Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen kommen (Huynh et al., 2007; Tanaka et al., 2000).

1.4 Lysosomale Biogenese

Die Biogenese des lysosomalen Kompartimentes beruht sowohl auf dem endozytotischen wie auch auf dem biosynthetischen Transportweg (Kornfeld and Mellman, 1989; Luzio et al., 2000).

Im Allgemeinen können lysosomale Proteine nach ihrer Synthese im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) und posttranslationalen Modifikationen im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) das Lysosom entweder direkt intrazellulär über sortierende endosomale Strukturen erreichen oder aber indirekt mit einem Umweg über die Plasmamembran. Hierbei gelangen die lysosomalen Proteine erst nach Endozytose ins Lysosom. Der endozytotische Transportweg durchläuft dabei frühe, intermediäre und späte endosomale Strukturen als Stationen, die durch ständige Austausch- und Fusionsereignisse fließend ineinander übergehen, sich aber morphologisch und durch bestimmte molekulare und biochemische Faktoren (z.B. pH-Wert) voneinander unterscheiden lassen (Saftig and Klumperman, 2009). Innerhalb dieses Transportweges stellen die verschiedenen morphologischen Erscheinungsformen des frühen Endosoms, wie zum Beispiel tubulär oder aber mit intraluminalen Vesikeln, Sortierungs- und Verteilungspunkte dar (Gould and Lippincott-Schwartz, 2009). In diesen Strukturen wird aber nicht nur endozytiertes Material sortiert, sondern sie dienen auch als Schnittstelle des endozytotischen mit dem biosynthetischen Transportweg. Dabei wird nach zu degradierendem Material und lysosomalen Proteinen, die weiter ins Lysosom geleitet werden, und zum Beispiel Rezeptoren, die zurück ins TGN oder aber an die Plasmamembran rezyklisieren, unterschieden. Letztere sind in tubulären Strukturen des frühen Endosoms (Peden et al., 2004) lokalisiert, wohingegen weiterzuleitendes Material eher in den Vakuolen des frühen Endosoms zu finden ist.

Der Transport der lysosomalen Membranproteine wird dabei durch Sortierungssignale in den zytosolischen Domänen vermittelt. Diese Signale basieren meist auf Dileucin- oder Tyrosin-Motiven und werden von zytosolische Adaptorproteinen erkannt, dies wiederum führt zur Ausbildung von Clathrin beschichteten Vesikeln (Robinson and Bonifacino, 2001; Bonifacino and Dell'Angelica, 1999). Für die löslichen lysosomalen Proteine wird grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Transportwegen unterschieden, einem M6P-abhängigen und einem M6P-unabhängigen Weg (Braulke and Bonifacino, 2009).

1.4.1 M6P-Rezeptor abhängiger Transportweg

Die lysosomalen Enzyme werden im rER synthetisiert und translozieren nach Abspaltung eines Signalpeptides in das Lumen des rER. Dort erfolgen direkt erste posttranslationale Modifikationen. So können die Proteine an Asparaginresten innerhalb der Erkennungssequenz NX[S/T] (wobei X weder P noch D) mit Oligosacchariden N-glykosyliert werden. Die Glykosylierung unterstützt dabei die Faltung der Proteine sowie deren Qualitätskontrolle, Sortierung und Transport (Helenius and Aebi, 2004). Nach dem vesikulären Weitertransport der Proteine zum Golgi Apparat werden im *cis*-Golgi-Netzwerk die Glykosylierungen zum Teil weiter modifiziert. Dabei werden Glykosylierungen der für den Transport ins Lysosom vorgesehenen Enzyme in einer sequentiell ablaufenden zweistufigen Modifikationsreaktion mit M6P-Resten markiert. Die so markierten Enzyme können dann von zwei spezifischen M6P-Rezeptoren (MPR) im spätem TGN erkannt werden (von Figura and Hasilik, 1986). Die Bindung an ein MPR46 Dimer ist dabei kationenabhängig, wohingegen sie beim MPR300 Monomer kationenunabhängig vonstattengeht (Ghosh et al., 2003). Durch die Bindung wird die Freisetzung von Clathrin bedeckten Vesikeln initiiert, die letztendlich mit dem endosomalen Kompartiment verschmelzen (van Meel and Klumperman, 2008). Im Endosom dissoziiert der M6P-Rezeptor-Liganden Komplex bedingt durch den erniedrigten pH-Wert und die M6P-Rezeptoren rezyklisieren zum TGN, wo sie für weitere Sortierungsprozesse zur Verfügung stehen (von Figura et al., 1987, Brown et al., 1986).

Zu geringen Anteilen sind die beiden M6P-Rezeptoren auch an der Plasmamembran lokalisiert, wobei aber nur der MPR300 für die Reinternalisierung von fälschlicherweise sezernierten M6P-markierten lysosomalen Proteinen über rezeptorvermittelte Endozytose verantwortlich ist (Braulke and Bonifacino, 2009).

1.4.2 M6P-Rezeptor unabhängiger Transportweg

Erste Hinweise auf einen M6P-Rezeptor unabhängigen Transportweg für lysosomale Hydrolasen ergaben Untersuchungen von Patienten mit der lysosomalen Speichererkrankung Mukopolipidosis Typ II (I-Zellerkrankung) (Leroy and Demars, 1967). Aufgrund von Mutationen innerhalb des N-Acetylglucosamin-Phosphotransferase Gens können bei dieser Erkrankung die lysosomalen Proteine nicht mehr mit einem M6P-Rest markiert werden (Hasilik et al., 1981; Reitman et al., 1981). So kommt es vor allem in Fibroblasten zur Fehlsortierung und vermehrten Sekretion der Enzyme, die in erhöhter Konzentration im Serum der Patienten nachgewiesen werden können (van Dongen et al., 1985). In nicht-mesenchymalen Gewebezellen der Patienten zum Beispiel in Hepatozyten, Kupffer-Zellen oder Lymphozyten sind die lysosomalen Enzymspiegel hingegen trotz fehlender M6P-

Markierung unverändert (Kornfeld and Sly, 1995; Martin et al., 1984). Darüber hinaus weisen Studien sowohl in M6P-Rezeptor defizienten murinen Zellsystemen (Dittmer et al., 1999) als auch im Mausmodell der I-Zellerkrankung mit fehlender N-Acetylglucosamin-Phosphotransferase (Gelfman et al., 2007) auf solche M6P-Rezeptor unabhängigen jedoch zelltyp-spezifischen Transportrouten für lösliche lysosomale Proteine hin. Eine der Routen könnte zum Beispiel der Transfer neusynthetisierter lysosomaler Enzyme von Lymphozyten oder Makrophagen in benachbarte Fibroblasten über direkte Zell-Zell-Kontakte sein (Olsen et al., 1981 and 1983; Abraham et al., 1985). Eine weitere Möglichkeit stellt die Reinternalisierung sekretierter Enzyme durch einen Multi-Liganden-bindenden Mannoserezeptor über Endozytose dar (Allavena et al., 2004). Offenbar steht dieser alternative Transportweg in Fibroblasten jedoch nicht zur Verfügung. Während in Hepatozyten die Reinternalisierung so effektiv verläuft, dass nahezu Wildtyp-ähnliche lysosomale Enzymlevel erreicht werden, versagt dieser Prozess anscheinend in kultivierten Fibroblasten (Dittmer et al., 1999).

Des Weiteren sind auch intrazelluläre, direkte M6P-Rezeptor unabhängigen Transportwege für einige lysosomale lösliche Proteine beschrieben. So wurde für die saure Sphingomyelinase (Ni and Morales, 2006) und Cathepsin D und H (Canuel et al., 2008; Canuel et al., 2009) ein direkter M6P unabhängiger Transportweg festgestellt. Als Transportrezeptor fungiert dabei das Typ I Transmembranprotein Sortilin, wobei die im Golgi Kompartiment stattfindende Bindung zwischen Ligand und Rezeptor im Gegensatz zum M6P-Rezeptor kohlenhydratunabhängig erfolgt (Saftig and Klumperman, 2009). Neben dem Transport von löslichen Enzymen dirigiert Sortilin auch Prosaposin direkt ins endosomale / lysosomale Kompartiment (Lefrancois et al., 2003). Aus dem Vorläuferprotein Prosaposin entstehen im Lysosom durch proteolytische Spaltung die vier nicht enzymatisch aktiven *Sphingolipid*-Aktivatorproteine Saposin A, B, C und D (Canuel et al., 2009; O'Brien and Kishimoto, 1991). Sie fungieren als Kofaktoren für die sauren Hydrolasen (Schuette et al., 2001), wie im Falle von β -Glucocerebrosidase (β -GC) das Saposin C (Beutler and Grabowski, 2001).

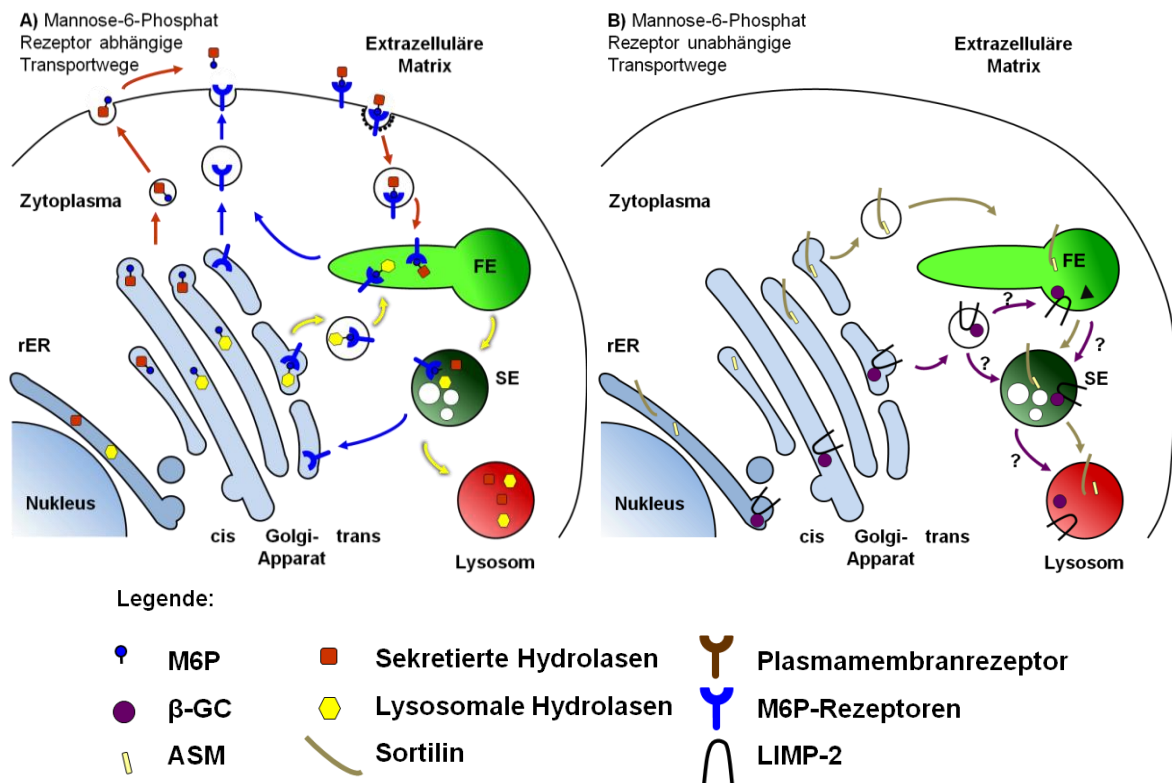


Abbildung 1.4-1: Transportwege lysosomaler Hydrolasen.

A) Der Großteil der lysosomalen Enzyme wird in Abhängigkeit von M6P-Rezeptoren (in blau) transportiert (vgl. Kapitel 1.4.1). Dieser Transport kann entweder durch Sekretion der Enzyme und ihrer Reinternalisierung über plasmamembranlokalisierte M6P-Rezeptoren (orangene Pfeile) oder aber intrazellulär erfolgen (gelbe Pfeile). Im frühen Endosom (FE) vereinigen sich die beiden Transportrouten wieder. Durch pH-Erniedrigung bei der Reifung des FE zum späten Endosom (SE) kommt es zur Dissoziation zwischen M6P-Rezeptor und Ligand. Die M6P-Rezeptoren rezyklisieren dann entweder zur Plasmamembran oder aber zum trans-Golgi-Netzwerk (blaue Pfeile). Das SE reift weiter zum Lysosom. B) Der Transport von β -GC vollzieht sich hingegen M6P-Rezeptor-unabhängig durch seinen Rezeptor, dem lysosomalen integralen Membranprotein LIMP-2 (vgl. Kapitel 1.4.3). Die Bindung der beiden Proteine erfolgt dabei schon im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER). Anschließend findet die Sortierung beider Proteine ins endosomale / lysosomale Kompartiment zusammen statt, dabei sind die genauen Details der Route aber noch nicht geklärt (lila Pfeile). Als ein weiterer M6P-Rezeptor-unabhängiger Transportweg lysosomaler Hydrolasen ist beispielhaft der der sauren Sphingomyelinase (ASM, *acid sphingomyelinase*) durch Sortilin dargestellt (vgl. Kapitel 1.4.2). Hier erfolgt die Bindung an das nach Prozessierung mature Sortilin erst im Golgi-Apparat, danach wird der Komplex analog zum M6P-Rezeptor abhängigen Weg sortiert (ocker farbende Pfeile), wobei ein Rezyklisieren des Sortilins nicht stattfindet. Auf die Darstellung der Clatrinhüllen und Adapterkomplexe, sowie möglicher Plasmamembranlokalisationen (im Falle von Abbildung B) wurde aus Übersichtsgründen verzichtet. Abbildung schematisch nach Lüllmann-Rauch, 2005.

1.4.3 Der β -Glucocerebrosidase Weg

Die 65 kDa schwere saure Hydrolase β -Glucocerebrosidase (β -GC) katalysiert die Hydrolyse der β -Glucosylbindung der Glucosylceramide in Ceramid und Glucose (Dvir et al., 2003). Mutationen im humanen β -GC Gen führen zur Ausbildung der am häufigsten vorkommenden lysosomalen Speichererkrankung mit einer durchschnittlichen Prävalenz von 1:40000 bis 60000, dem Morbus Gaucher (Beutler, 1991 und 2006). Hervorgerufen wird die autosomal rezessiv vererbte Gaucher-Erkrankung unter anderem durch β -GC Varianten mit verminderter Enzymaktivität oder aber durch solche bei denen die korrekte lysosomale Sortierung beeinträchtigt beziehungsweise verhindert ist. Infolgedessen kommt es in den Makrophagen

der Patienten zur lysosomalen Substratakkumulation und der Ausbildung von angeschwollenen Gaucher-Speicherzellen, die v.a. in der Milz, Leber und im Knochenmark zu finden sind. Entsprechend dem sich daraus ergebendem neurologischen Phänotyp wird das Syndrom in zwei Subtypen klassifiziert.

Der nicht neuronopathische Phänotyp (ehemals Typ I), bei dem noch eine relative hohe β -GC Restaktivität erhalten ist, weist keine neurologischen Symptome auf und tritt meist erst im Erwachsenenalter ein. Im Krankheitsverlauf kann es jedoch zur Spleno- und Hepatomegalie und den damit verbundenen Funktionsstörungen kommen. Auch das skeletale und das blutbildende System können betroffen sein (Beutler and Grabowski, 2001). Neuere Ergebnisse weisen dabei auf einen Zusammenhang zwischen Gaucher Typ 1 und der Entwicklung von Morbus Parkinson in diesen Patienten hin (Yap et al., 2011; Biegstraaten et al., 2008).

Im Falle des schon im Säuglings- bzw. Kindesalter einsetzenden neuronopathischen Phänotyps (ehemals Typ II und III) wird nochmals eine Unterscheidung in eine seltene akut letale und chronische Verlaufsform getroffen. Bei beiden Verlaufsformen können zusätzlich zu den obengenannten Symptomen Nervenschädigungen, die sich zum Beispiel in Epilepsien manifestieren, festgestellt werden (Gupta et al. 2011).

Auch wenn einige spezielle β -GC Mutationen zu einem vermehrten Auftreten eines bestimmten Phänotyps führen, ist eine allgemeingültige Genotyp-Phänotyp Korrelation dennoch nicht feststellbar (Theophilus et al., 1989; Atrian et al., 2008; Hruska et al., 2008). Eine kausale Therapie des neuronopathischen Morbus Gaucher kann mittels Enzym-Substitution mit rekombinant hergestellter β -GC oder durch Substratreduktion erfolgen (Sawkar et al., 2006).

Da β -GC bei der I-Zellerkrankung auch in mesenchymalen Geweben z.B in den Fibroblasten korrekt lysosomal lokalisiert ist (Aerts et al., 1988), wurde für dieses Enzym ein M6P-Rezeptor unabhängiger Transportweg postuliert. Gestützt wird dies auch durch die unveränderte korrekte Lokalisierung von β -GC in murinen M6P-Rezeptor doppeldefizienten Fibroblasten, während der überwiegende Teil der anderen lysosomalen Enzyme sezerniert wird (Dittmer et al., 1999; Reczek et al., 2007).

Als Rezeptor für den M6P unabhängigen Transport von β -GC konnte initial durch Affinitäts-Chromatographie das lysosomale integrale Membranprotein Typ II (LIMP-2) identifiziert werden (Reczek et al., 2007). Weiterführende Untersuchungen ergaben dann eine Fehlsortierung und Sekretion von β -GC in LIMP-2 defizienten embryonalen Mausfibroblasten (MEF), Makrophagen und bei den entsprechenden LIMP-2 defizienten

Mäusen ins Serum, während die Sortierung der anderen lysosomalen Enzyme unverändert erschien (Reczek et al., 2007).

1.5 Der β -Glucocerebrosidase Rezeptor LIMP-2

Vor etwa 25 Jahren wurden die Haupt-Glykoproteine der lysosomalen Membran identifiziert und erstmalig biochemisch charakterisiert (Barriocanal et al., 1986; Lewis et al., 1985). Eines dieser Proteine ist das lysosomale integrale Membranprotein Typ II (LIMP-2; SCARB2).

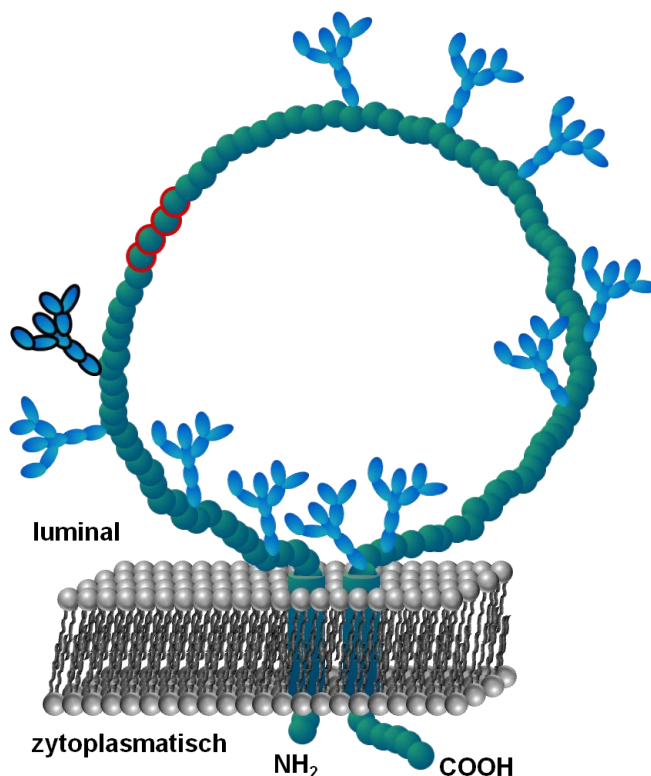


Abbildung 1.5-1: Schematische Darstellung der LIMP-2 Struktur.

Die Lage der potentiellen N-Glykosylierungen innerhalb der luminalen Domäne ist durch die blautürkisen Zuckerbäumchen dargestellt. Die zusätzliche N-Glykosylierungen in der murinen gegenüber der humanen LIMP-2 Variante ist schwarz umrandet. Das für die Bindung zur β -GC verantwortliche *coiled-coil* Motiv ist rot umrandet. Das Größenverhältnis zwischen luminalen und zyttoplasmatischen Anteil ist maßstabsgetreu abgebildet.

LIMP-2 gehört in die *Cluster of Differentiation 36* (CD36) Superfamilie und weist eine 34%ige Aminosäurenidentität mit dem multifunktionalen Plasmamembranrezeptor CD36 auf (siehe Abbildung 1.5-2) (Silverstein and Febbraio, 2009). Wie dieser besitzt LIMP-2 eine Typ III Topologie mit zwei Transmembrandomänen und einen großen luminalen Bereich als Sekundärstruktur (siehe Abbildung 1.5-1). Ein weiteres Mitglied der CD36 Scavenger-Rezeptor-Familie ist CLA1/SCARB1 Isoform1 (SR-BI) und die Splicevariante CLA2/SCARB1 Isoform2 (SR-BII), diese sind an der Zelloberfläche u.a. verantwortlich für den Import von Cholesterol und Cholesterinestern aus HDL-Partikeln (Connelly and Williams, 2004; Calvo et al., 1995; Krieger and Herz, 1994).

Einleitung

	10	20	30	40	50	60	70	80							
CD36	MG-CDRNCGLI	AGA--VIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIK	KQVVLEEGTIA	FKNWVKTGTGEVYRQFWIF	FDVQNPQ	EV			77						
Cla1	MG-CSAKARWA	AGALGVAGLLCAVLGAVMIVMVPSLIKQQL	KNVRIDPSSLS	FNMWKEIPIPF	YLSVYFF	FDV	MNPSEIL		79						
LIMP-2	MGRCC--	-FYTAGT	LSLL-LLVTSVTL	LLVARVFQKAVDQ	SIEKKIVLR	NGTEAF	DSWEKPPLPV	YTQFYFF	FNVTNPEIL 76						
	90	100	110	120	130	140	150	160							
CD36	MNSSNIQ	VKQ	GPYT	YRVRFLA	KENV	TQDAEDNTV	SFLQPNGAIFEP	SLSVGTEADNFTV	---LNLAVAAASHIYQNQFV 154						
Cla1	-KGEKPQ	VRE	RG	GPYVYR	-EFRH	KSNITFNNNDT	-VSFLEYRTFQFQPSKSH	GSESDYIVMPN	ILVLGAAMMENKPM	T-L 155					
LIMP-2	-RGETPR	VEEV	GPYT	YR-ELRN	KANI	QFGD	NGTTIS	AVSNKAYVFERDQ	SVGDPK--IDLIRT	LNIPVLTVIEWSQVHFL 152					
	170	180	190	200	210	220	230	240							
CD36	QMILNSLINKSKSSM	FQVR	TLRELL	WGYRDP	PFLSLVP	-----Y	PVTTTVGLFYPY	NTADGVYKVFNG	KDNISKVAIID 228						
Cla1	KLIMTLAFTTLGERA	FMNRT	TVGE	IMWGYKD	PLVNLINKYFPGMF	PFKDKF	GLFAELNNSDS	GLFTVFT	GVQNISR	IHLVD 235					
LIMP-2	REITIEAMLKAYQQKL	FVTH	TVDELL	WGYKDEIL	LSLIHVFRPD	ISPY---	FGLFYEK	NGTNDG	DYVFLT	GEDSYLNFT	KIV 229				
	250	260	270	280	290	300	310	320							
CD36	TYKGKRNLSY	WES-H	CDMINGT	DAASFP	PFVEKSQV	LQFFSSDI	CRSIYAVFESDVNLK	GIPVYR	FVLPSKAF	ASPVENP 307					
Cla1	KWNGLSKVDF	WHS	DQCNMINGT	SGQMWP	PFMTPESS	LEFYSP	EACRS	MKLMYKESGV	FEGIP	TYR	FVAPKTLFANGSIYP 315				
LIMP-2	EWNGK	TSLDW	WITDK	CNMINGT	DGDSFH	PLITKDEV	LVYVFP	SDFCRS	VYITFSDY	ESVQGLPA	FRYKVP	AEILANTS---	306		
	330	340	350	360	370	380	390	400							
CD36	DNYCFC	TEKIISKNC	TSYGVLDI	SKCKEGR	PVYISL	PHFLY	ASPDVSEPID	GLNPNEE	EHRTYLDIE	PITG	FTLQFAKRL 387				
Cla1	PNEGFC	-----	PCLES	GIQNV	STCR	FSA	PLFLSH	PHFLNADPVLAEAVT	GLHPNQ	EAHSLFLDI	HPVTGIP	MNC	SVKL 388		
LIMP-2	DNAGFC	---	IPEGNC	LGS	GV	LVNS	ICKNGA	PIIMS	FPHFYQ	ADERFVSAIE	GMHPNQ	EDHET	FVDIN	PLTGIILKA	KRF 383
	410	420	430	440	450	460	470	480							
hCD36	QVNLLV	KPSEKI	QVLK	NLKRNYIV	PILWLNET	GTIGDE	KANMFRS	QVTGKINLLGLIEMILL	SVGVVMFVAF	MISYCACR 467					
hCla1	QLSLYM	KSVAGIG	QTGKI	-EPVVL	PLLWFA	ESGAMEGE	TLHTFTYTQ	LVLMPKVMHYAQYVLLAL	GCVLLLV	PVI--	CQIR 465				
LIMP-2	QINIVY	KKLDDF	VETGDI	-RTMV	F	VMYLN	ESV	HI	DKETASRL	-KSMINT	TLIT	ITNIPYI	IMAL	GVFFGLV	----- 452
	490	500	510	520											
CD36	SK-----														TIK. 473
Cla1	SQEKCYL	FWS	SSK	KGSKD	KEAIQAY	SESLMT	SAPKGS	VLQ	EAKL. 510						
LIMP-2	-----	FTWL	ACKG	QGS	MDEGT	ADERAP	LI-----								RT. 479

Abbildung 1.5-2: Multiples Aminosäuren-Alignment der humanen CD36 Familie.

In blau sind konservierte Aminosäurenreste dargestellt. Die das *coiled-coil* Motiv bildenden Aminosäuren innerhalb der LIMP-2 Sequenz sind in rot, die potentiellen Glykosylierungsstellen in grün hervorgehoben. Die beiden vorhergesagten Transmembrandomänen sind unterstrichen. Das Alignment wurde mit Hilfe des Clustal V Algorithmus erstellt.

Die cDNA von LIMP-2 kodiert für 478 Aminosäuren, die ein errechnetes Molekulargewicht von 53-54 kDa für den Polypeptidkern ergeben. Eine speziesabhängige Erhöhung des Molekulargewichtes auf 73-85 kDa ergibt sich durch 11 potentielle luminaire N-Glykosylierungen (Tabuchi et al., 1997; Fujita et al., 1992; Okazaki et al., 1992; Fujita et al., 1991; Vega et al., 1991b). Diese dienen vermutlich dem Schutz vor hydrolytischer Degradierung im Lysosom (Kundra and Kornfeld 1999, Barriocanal et al., 1986). Ein Einfluss der Glykokalix auf die Faltung oder Transport von LIMP-2 ist jedoch auch möglich (Barriocanal et al., 1986). Die sialylierten Zuckerketten sind sowohl vom komplexen (Vega et al., 1991a) als auch vom mannosereichen Typ (Barriocanal et al., 1986).

Die N-terminale Transmembrandomäne wird durch das N-terminale Signalpeptid gebildet, welches nach Translokation ins rER nicht abgespalten wird. Der zytoplasmatische N-Terminus fällt mit nur zwei bis vier Aminosäuren je nach Spezies sehr kurz aus, zudem konnte ihm bisher noch keine Funktion zugeordnet werden. Dagegen enthält der circa 20 Aminosäure lange C-terminale zytoplasmatische Anteil von LIMP-2 als lysosomale Erkennungs- und Sortierungssequenz ein Di-Leucin bzw. Isoleucin-Motiv, das aus den

Aminosäuren L475 und I476 besteht (Ogata and Fukuda, 1994; Sandoval et al., 1994). Motive dieser Art werden von zytosolischen Adapterkomplexen erkannt (Fujita et al., 1999; Le Borgne et al., 1998). Im Falle von LIMP-2 ist die Bindung zum Adapterprotein-Komplex 3 (AP3) am spezifischsten (Höning et al., 1998). Somit wird LIMP-2 vermutlich über AP3 in Clathrin beschichteten Vesikeln ins Lysosom transportiert (Rodionov et al., 2002; Schmid, 1997).

Mutationen innerhalb des aus der konservierten Konsensussequenz [DE]XXXL[L/I] bestehenden Di-Iso/Leucin Sortierungssignals von LIMP-2 (DERAPLI) führen entweder wie bei der Mutation des Leucins L475 zur kompletten Fehlsortierung des Proteins zur Plasmamembran (Sandoval et al., 1994) oder verhindern nur wie bei der Mutation des Isoleucins an Position 476 die endgültige lysosomale Lokalisation, so daß diese LIMP-2 Mutanten in spät endosomalen Strukturen erscheinen (Tabuchi et al., 2002). Aber nicht nur die das Di-Leucin bzw. Isoleucin-Motiv bildenden Aminosäuren sind entscheidend. So ist die Bindung von LIMP-2 an AP3 auch vom sauren Charakter der beiden Aminosäuren D470 und E471 abhängig. Diese haben darüber hinaus einen Einfluss auf die Akkumulation von LIMP-2 in frühen und späten Endosomen (Tabuchi et al., 2000). Durch die drei genau vor dem Di-Leucin bzw. Isoleucin Motiv gelegenen Aminosäuren (R472; A473 und P474) wird letztendlich die Spezifität zur Bindung an AP3 vermittelt und damit der direkte Sortierungs- bzw. Transportweg ohne Umweg über die Plasmamembran (Rodionov et al., 2002; Höning et al., 1998), wie er etwa für andere lysosomale Membranproteine beschrieben ist (Braulke and Bonifacino, 2009; Niwa et al., 2003).

Eine transiente Überexpression von LIMP-2 in zum Beispiel COS-Zellen führt zur Akkumulation und Vergrößerung von endosomal / lysosomalen Kompartimenten aufgrund einer Beeinträchtigung des endozytotischen Membranflusses (Kuronita et al., 2002). Damit einhergehend ist eine Verringerung der Anzahl an Lysosomen in den Zellen, vermutlich aufgrund einer erhöhten Fusion mit späten Endosomen (Kuronita et al., 2002). Der N-terminalen Transmembrandomäne sowie dem proximal zur N-terminalen Transmembrandomäne gelegenen luminalen Aminosäurenbereich 31 bis 155 kommt dabei besondere Bedeutung zu wie sich in Mutationsstudien zeigen ließ (Kuronita et al., 2005). Keine morphologischen Veränderungen in Zellkultursystemen lassen sich hingegen bei Überexpression anderer lysosomaler Membranproteine wie LAMP-1 oder LAMP-2 feststellen (Kuronita et al., 2002). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass LIMP-2 eine spezifische Funktion bei der Regulation des endozytotischen Transportsystems und der lysosomalen Biogenese besitzt (Kuronita et al., 2005).

Um die Bedeutung von LIMP-2 u.a. für die lysosomale Biogenese auch *in vivo* studieren zu können, wurde ein LIMP-2 defizientes Mausmodell generiert (Gamp et al., 2003). Neben einer erhöhten postnatalen Sterblichkeit gegenüber Kontrolltieren in Folge einer Hydronephrose weisen die LIMP-2 defizienten Mäuse physiologisch unter anderem auch neuronale Veränderungen im Zentralnervensystem in Folge der LIMP-2 Defizienz auf. Die Abwesenheit von LIMP-2 führt dabei zu einer Demyelinisation durch die Abnahme der peripheren Nerven-Myelin-Proteine MBP und PMP22. Dabei ist aber unklar, ob dies aufgrund von Fehlsortierung oder vermehrter lysosomaler Degradation geschieht (Gamp et al., 2003). Des Weiteren weisen die Mäuse ein vermindertes Hörvermögen auf, das durch eine fehlerhafte Verteilung und Lokalisierung bestimmter neuronaler Kaliumkanäle hervorgerufen werden könnte (Knipper et al., 2006). Im zerebralen und zerebellaren Cortex dieser Mäuse konnten darüber hinaus vergleichbar wie bei Patienten mit einer AMRF (*action myoclonus-renal failure syndrom*) Erkrankung (siehe Abschnitt 1.7) intrazelluläre Ablagerungen in Einschlusskörperchen identifiziert werden, die sich in einer Ataxie manifestieren (Berkovic et al., 2008).

Obwohl LIMP-2 hauptsächlich in der endosomalen / lysosomalen Membran exprimiert ist, findet sich in bestimmten Zellpopulationen ein geringer Anteil von LIMP-2 zusätzlich plasmamembranständig lokalisiert (Akasaki et al., 1994). Dort kann LIMP-2 somit auch als putativer Rezeptor dienen. Eine solche Plasmamembran-Rezeptorfunktion von LIMP-2, vermittelt durch die luminal Domäne, wird zum Beispiel für das Enterovirus 71 diskutiert (Yamayoshi et al., 2009; Yamayoshi and Koike 2011). Als ein weiterer Interaktionspartner von plasmamembranständigem LIMP-2 konnte N-Cadherin innerhalb der Glanzstreifen von Herzmuskelzellen identifiziert werden. Dabei moduliert LIMP-2 anscheinend die Plasmamembran-Lokalisation wie auch die Bindung von N-Cadherin an β -Catenin (Schroen et al., 2007).

1.6 Die Interaktion zwischen β -GC und LIMP2

Für LIMP-2 defiziente embryonale Mausfibroblasten und Makrophagen konnte gezeigt werden, dass sie eine erniedrigte Konzentration an β -GC im Lysosom aufweisen. Dafür ist jedoch eine signifikante Erhöhung des Enzyms im Zellkulturüberstand zu beobachten, bzw. *in vivo* eine erhöhte Enzymaktivität im Serum der Mäuse. Eine Restaktivität von β -GC in den LIMP-2 defizienten embryonalen Fibroblasten und Makrophagen verhindert aber wahrscheinlich die vollständige Ausbildung des Morbus Gaucher Phänotyps in diesen Mäusen. Durch die Transfektion mit einem Wildtyp-LIMP-2 Konstrukt ist eine erfolgreiche Korrektur der β -GC Missortierung *in vitro* in diesen LIMP-2 defizienten Zellen möglich

(Reczek et al., 2007). Dies zusammen mit der Tatsache, dass β -GC bei der I-Zellerkrankung (siehe Abschnitt 1.4.2) weiterhin lysosomal lokalisiert ist (van Dongen et al., 1985), deutet auf eine Transportfunktion von LIMP-2 für β -GC hin.

Die Interaktion zwischen LIMP-2 und β -GC erfolgt durch die luminal Domäne von LIMP-2 und scheint innerhalb der CD-36 Familie spezifisch zu sein (Reczek et al., 2007). So bindet LIMP-2 zwar *in vitro* das eigentliche CD36-Substrat Thrombospondin-1 (Crombie and Silverstein, 1998), CD36 hingegen ist nicht in der Lage mit β -GC zu interagieren (Reczek et al., 2007). Weitere Experimente mit LIMP-2 führten zur Identifikation eines hochkonservierten *coiled-coil* Motivs (Burkhard et al., 2001) innerhalb der luminalen Domäne zwischen den Aminosäuren 152 bis 167 (siehe Abbildung 1.6-1) als notwendige Bindestruktur für die Interaktion mit β -GC (Reczek et al., 2007). Auch wenn sich dabei vermutlich keine klassische *coiled-coil* Struktur wie zum Beispiel bei der *Leucin-Zipper* Domäne einiger Transkriptionsfaktoren (Lupas, 1996) ausbildet und das Motiv alleine nicht hinreichend ist, so ist die *coiled-coil* Domäne doch der entscheidende Faktor für den korrekten Transport der β -GC zum Lysosom. Bestätigt wird dies durch Mutationsstudien (Reczek et al., 2007) und durch die Charakterisierung klinischer LIMP-2 Mutanten (siehe Abschnitt 1.7) (Blanz et al., 2010).

Mensch	146	WSQVH-F	<u>LR</u> ETI <u>EA</u> MLKAYQOKL	FVTHTVDELLWGYKDEILSLIHVFRPD	ISPYFGLFYEKNGTNDGDYVF-215
Schimpanse	146	WSQVR-F	<u>LR</u> ETI <u>EA</u> MLKAYQOKL	FVTHTVDELLWGYKDEILSLIHVFRPD	ISPYFGLFYEKNGTNDGDYVF-215
Makake	146	WSQVH-F	<u>LR</u> ETI <u>EA</u> MLKAYQOKL	FVTHTVDELLWGYKDEILSLIHVFRPD	ISPYFGLFYEKNGTNDGDYVF-215
Rind	357	WTQLP-L	<u>LR</u> DI <u>EA</u> LLKAYRQKL	FVTHTVDELLWGYKDEILSLINTFKHDVSPYFGLFYGKNGTNDGDYVF-426	
Ratte	146	MAQQP-F	<u>LR</u> ETI <u>EA</u> MLKAYQOKL	FVTHTVHELLWGYKDEVLSLVHIFRPDVSPNFGLFYERNGTNDGEYVF-215	
Maus	146	LAQLT-L	<u>LR</u> ELI <u>EA</u> MLKAYQOKL	FVIHTVHELLWGYKDEILSLVHIFKPDVSPNFGLFYERNGTNDGEYVF-215	
Huhn	146	WTRAT-S	LQFATEVLLLLYQESLFTVTRTVHELLWGYKDKLLSTIHLHPEIDPVFGFFNKMNGTDDGEYVF-215		
Frosch	146	MTKDSRILRPLIIAILKTSKEGMFVTRTVDELLWGYKDPVLSFLHTFNHSVSDTFGLFYKMNTDDGEYVF-216			

Abbildung 1.6-1: Sequenz Alignment verschiedener LIMP-2 Spezies.

Das *coiled coil* Motiv mit seinem Heptadenmuster ist rot unterstrichen und die sich wiederholenden hydrophoben Reste an den Positionen 1 und 4 innerhalb der α -Helix sind blau markiert.

1.7 AMRF Mutanten und die Bedeutung verkürzter LIMP-2 Formen

Ähnlich der LIMP-2 defizienten Maus mit ihrem neurologischen und renalen Phänotyp (s.o.), manifestiert sich im Menschen bei Mutationen im LIMP-2 Gen (4q13-21) (Berkovic et al., 2008) eine AMRF Erkrankung (Badhwar et al., 2004). Die Patienten zeigen bei dieser schwerwiegenden autosomal-rezessiven Erkrankung unter anderem eine Nierenfehlfunktion bis hin zum Nierenversagen auf Basis einer fokalen Glomerulosklerose als renales Symptom und progressive myoklonische Epilepsien und Ataxien als Anzeichen neurologischer Funktionsstörungen. Im Gehirngewebe von AMRF Patienten konnte, vergleichbar wie bei anderen neurologischen Erkrankungen, Aggregatablagerungen identifiziert werden. Welcher Art diese sind, ist hingegen noch nicht geklärt.

Einleitung

In letzten 3 Jahren konnten einige AMRF hervorrufende homo- und heterozygote Mutationen innerhalb des LIMP-2 Gens diagnostiziert werden. Das Spektrum (siehe Abbildung 1.7-1) reicht dabei von Punktmutationen (*missense mutation*) (Velayati et al., 2011; Dardis et al., 2009) bis zu trunkierenden Mutationen durch Leserasterverschiebung oder das Einfügen eines vorzeitigen Stoppcodons (*nonsense mutation*) (Hopfner et al., 2011; Dibbens et al., 2011; Balreira et al., 2008; Berkovic et al., 2008). Es lässt sich aber vergleichbar wie beim Morbus Gaucher keine klare Genotyp-Phänotyp Korrelation feststellen (Dibbens et al., 2011; Rubboli et al., 2011; Dibbens et al., 2009).

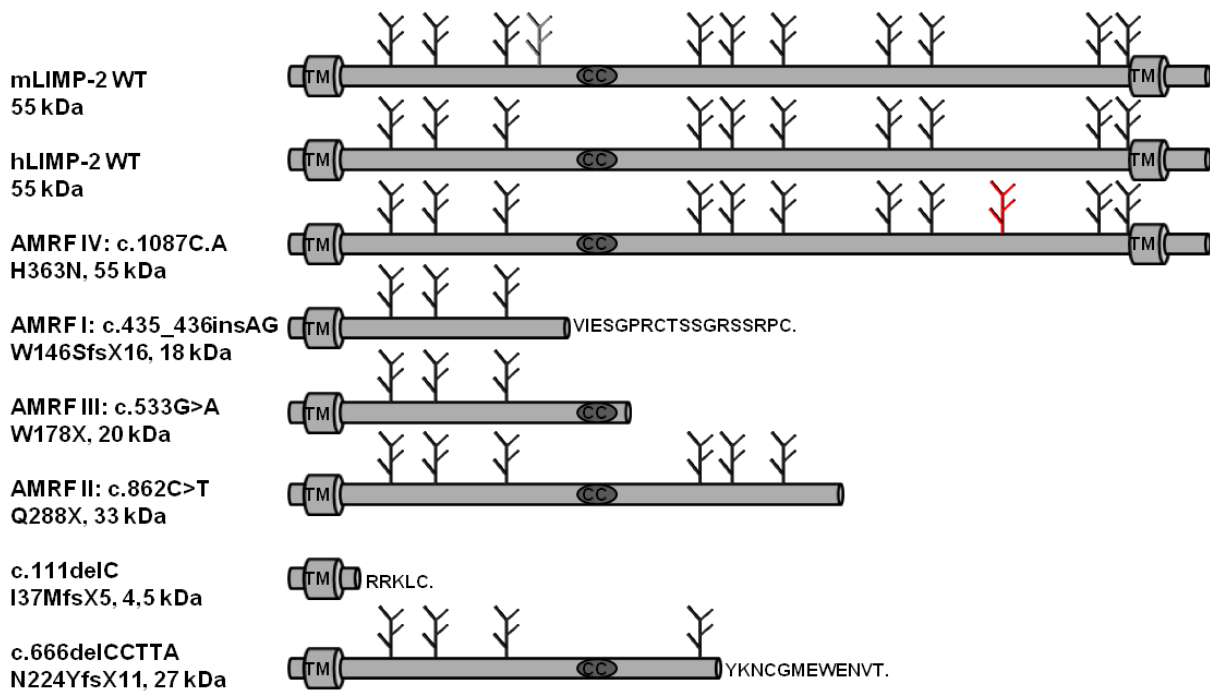


Abbildung 1.7-1: Spektrum der homozygoten LIMP-2 AMRF Mutationen.

Schematische Darstellung der LIMP-2 AMRF Varianten unter Angabe des Gewichtes in kDa für den jeweilige Polypeptidkernanteil. Die Lage der potentiellen Glykosylierungen ist ebenfalls schematisch dargestellt. Die durch die H363N Mutation hervorgerufene zusätzliche Glykosylierungsstelle ist in rot hervorgehoben. CC steht für das *coiled-coil* Motiv, TM markiert die Transmembrandomänen (Abbildung modifiziert nach Blanz et al., 2010).

Alle bisher untersuchten AMRF Mutanten weisen dabei eine ER Retention auf, die mit einer verminderten lysosomalen β -GC Lokalisation einhergeht (Blanz et al., 2010). Es zeigte sich aber, dass die trunkierten LIMP-2 AMRF Varianten eine unterschiedliche Bindeaffinität gegenüber ihrem Liganden β -GC besitzen (Blanz et al., 2010). Mit Hilfe der klinischen AMRF Mutationen, die zu einer verringerten Expression von unterschiedlich stark verkürztem LIMP-2 Protein führen, konnte die Bindestelle zwischen LIMP-2 und β -GC auf den Bereich um das schon beschriebene *coiled-coil* Motiv zwischen den Aminosäuren 145 und 288 innerhalb der luminalen Domäne von LIMP-2 eingegrenzt, jedoch nicht vollständig definiert werden.

2 Fragestellung

Das lysosomale integrale Membranprotein Typ 2 (LIMP-2) wurde kürzlich als Transportrezeptor der lysosomalen Hydrolase β -Glucocerebrosidase (β -GC) identifiziert.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt existiert allerdings keine detaillierte Struktur von LIMP-2. Auch die Art und Modulation der LIMP-2 / β -GC Interaktion ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Bild der LIMP-2 Struktur zu verfeinern und die Interaktion zwischen LIMP-2 und β -GC genauer zu beschreiben.

Ausgehend von der Verifizierung eines zuvor postulierten Strukturmodells der luminalen LIMP-2 Domäne, soll der Glykosylierungsstatus von LIMP-2 aufgeklärt werden. Weiterhin wird der Einfluss einzelner N-Glykosylierungsstellen auf Struktur, Funktion und Transport des Proteins untersucht.

Neben der strukturellen Charakterisierung ist die Analyse einer potentiellen Dimerisierung von LIMP-2 ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Zu diesem Zweck werden neu etablierte *Crosslink*-Methoden angewendet.

Im Zuge dessen sollen Untersuchungen hinsichtlich des genauen Mechanismus der Interaktion mit der β -GC und der Zusammensetzung des LIMP-2 / β -GC Komplexes durchgeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

96-Well-Mikrotiterplattenleser	Synergy HT	BioTek, Bad Friedrichshall
	TECAN Sunrise	TECAN, Crailsheim
Agarosegel-Dokumentationsanlage	Gel Jet Imager UV System	Intas, Göttingen
CD-Küvetten	Quarzglas QS Schichtdicke 0,5mm	Hellma Analytics GmbH & Co. KG, Müllheim
CD-Spektrometer	J-720	Jasco, Gross-Umstadt
Chemoluminiszenzkamera	ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare, München
Dest.Wasseranlage	MilliQ Plus	Millipore, Schwalbach
Dynamische Lichtstreuung Goniometer	Laser Spectroscatter 201	RiNA GmbH, Berlin
Elektrophoresekammer für Agarosegel	Mini SubCell GT SubCell GT	BioRad, München
Elektroporationssystem	GenePulser™ System	BioRad, München
Elektroporationsküvetten		PeqLab, Erlangen
Größenausschluss-chromatographie (SEC) Anlagen	ÄKTA explorer + Frac900 ÄKTA purifier + Frac920	GE Healthcare, München
Größenausschluss-chromatographie (SEC) Säulen	Superdex200 Hiload 10/300 Superdex200 Hiload 16/60 Superdex Peptide 10/300GL	GE Healthcare, München
Horizontalschüttler	Titramax 100	Heidolph, Schwabach
	Swip KL-2	Edmund Bühler, Tübingen
Inkubatoren und Trockenschränke		
Brutschrank (Bakterien)	MEMMERT Modell 200	Memmert, Schwabach
Inkubationsschüttler (Hefen)	MultitronII	INFORS-HT, Einsbach
Mini/Midi Inkubator (Bakterien)	B6760	Heraeus, Hanau
	Certomat H & R	Sartorius BBI Systems, Göttingen
Zellinkubator	HeraCell240	Heraeus, Hanau

Material und Methoden

Magnetrührer	IKA-CombiMag RCT IKA MAG REO KMO2 electronic	IKA, Staufen
Mikroskope		
Durchlicht/Phasenkontrast für die Zellkultur	CKX41	Olympus, Hamburg
	Eclipse TS100	Nikon Instruments Europe B.V., Badhoevedorp NL
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
konfokales Laser- Scanning-Mikroskop	IX81 + Fluoview FV1000	Olympus, Hamburg
Mikrowellenherd	MN-5252B / SS-578H	Panasonic, Hamburg
PCR Cycler	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Wellesley MA USA
pH-Meter	Modell 646 und 511	Knick, Berlin
Photometer		
OD ₆₀₀ -Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
UV/VIS-Photometer	NanoDrop ND1000	Thermo Scientific, Bonn
Pipetten	Reference Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accujet pro	Thermo-Brand (Thermo Fisher Scientific), Waltham MA USA
Rollatoren		
Drehrad	Inkubations-Mischdrehrad	Eigenbau, Werkstatt Biochemie Kiel
Rollenmischer	RM5	Karl Hecht KG, Sondheim
	SRT9 und SRT9D	Stuart, Staffordshire UK
Überkopffrotator	Reax2	Heidolph, Schwabach
SDS-PAGE- Elektrophoresekammer	Mini-Protean 3- Elektrophorese-System	BioRad, München
	Novex Mini-Cell	Life Technologies GmbH (Invitrogen), Darmstadt
Semi-Dry-Blot-Apparatur	Trans-Blot SD	BioRad, München
Spannungsquellen	PowerPac 200 PowerPac 300 PowerPac basic PowerPac HC	BioRad, München
Sterilbench	VFR 1806	DanLaf, Kopenhagen Denmark
Tank-Blot-System	Criterion Blotter	BioRad, München

Material und Methoden

Thermomischer	Thermomixer 5436 comfort 5350 compact 5355 Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgeräte		
Badsonde	Branson Sonifier 450	G.Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Stabsonde	Micro Ultrasonic Cell Disrupter KT-50	Kimble/Kontes, Vineland NJ USA
UV Handlampe	3UV-38 LAMP	UVP, Cambridge UK
UV-Tisch	Reprostar	Lamag, Berlin
Vakuumpumpe	WP6122050	Millipore, Billerica, MA USA
Vortexer	Reax top	Heidolph, Schwabach
	Vortex-Genie K550-GE Vortex-Genie2 G560E	Bender&Hobein AG, Zürich Schweiz
Waagen	Feinwaage 770	Kern & Sohn, Dürrewangen
	Laborwaage L420P	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder		
Umwälzwasserbad mit Thermostat	Haake D8 Fisons + G	Haake, Karlsruhe
Schüttelwasserbad	Typ 1083	GFL, Burgwedel
Wasserbad	Typ 1002	GFL, Burgwedel
Zentrifugen		
Großzentrifugen	Multifuge 3SR+	Heraeus, Hanau
	J2-HS Centrifuge (JA17 Rotor)	Beckmann, Krefeld
	Universal32 Typ1605	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifugen	Biofuge fresco21	Heraeus, Hanau
	Centrifuge 5417i	Eppendorf, Hamburg
	Mikro220R	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415C Centrifuge 5415D Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
	MiniFuge DW41BR-230	Qualitron, Korea
Ultrazentrifuge	Optima TLX- Ultracentrifuge (TLA55 Rotor)	Beckmann, Krefeld

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser (ø 13mm)	Assistent, Sondheim
Glasgeräte	Schott, Mainz
Gasperlen	Sigma Aldrich, Steinheim
Handschuhe (Nitril/Latex)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Küvetten (10 x 4 x 45 mm & 10 x 10 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikro-Schraubröhre (2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulose Membran (Whatman Protran)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, UK
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim
PCR-Gefäße (Multiply-Pro 0,2ml, PP)	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (100 x 20mm, PP)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000µl/200µl/20µl)	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße für Ultrazentrifugation (1,5ml)	Beckman, Fullerton, USA
Serologische Pipetten (25ml, 10ml, 5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell (<i>Feather No.10</i>)	PFM, Köln
Stericup Filtereinheiten 0,2µm	Millipore, Schwalbach
Sterile Plastikröhrchen (50ml/15ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter Filtropurs 0,2µm	Sarstedt, Nümbrecht
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Vivaspin20 Ultrafiltrationseinheiten	Sartorius AG, Göttingen
Whatman-Papier	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (25cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (6-Well, Flachboden)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (100 x 20mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber (24cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.1.2 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid (Rotiphorese 30)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agarose (Seakem LE)	Lonza Köln GmbH, Köln
Alkalische Phosphatase (FastAP)	Fermentas, St. Leon-Rot

Material und Methoden

Ampicillin	Melford Laboratories, Chelsworth, UK
APS (p.a.)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bafilomycin A1	Sigma Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Complete Protease-Inhibitor</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
D ₂ O	Campro Scientific GmbH, Berlin
DABCO	Sigma Aldrich, Steinheim
DAPI	Sigma Aldrich, Steinheim
deuterierte Essigsäure (C ₂ D ₄ O ₂)	Riedel-de Haën, Seelze
DMSO	Serva, Heidelberg
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
1 kb & 100 bp DNA-Standard	Fermentas, St. Leon-Rot
DSS und BS ³	Pierce / Thermo Fisher Scientific, Bonn
EBSS (Earle's Balanced Salt Solution)	Gibco / Life Technologies, Darmstadt
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EndoH	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EndoH _f	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Ethanol (99,8%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung (1%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (Standard-FCS; A15-101)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Fötale Kälberserum (dialysiertes-FCS)	Pierce / Thermo Fisher Scientific, Bonn
FuGeneHD Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Glycerin (86%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hepes	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Immobilized ProteinG</i> (Agarose)	Pierce / Thermo Fisher Scientific, Bonn
INTERFERin Transfektionsreagenz	Polyplus transfection/Peqlab, Erlangen
Isopropanol (p.a.)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma Aldrich, Steinheim
6 x Ladepuffer für Agarosegele	Fermentas, St. Leon-Rot
Milchpulver (<i>blotting grade</i>)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol (p.a.)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mowiol	Calbiochem, Darmstadt
4-Nitrophenyl β-D-Glucopyranoside	Sigma Aldrich, Steinheim
N-Glycosidase F (PNGaseF)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

N-Glycosidase F (PNGaseF)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
NP-40	Calbiochem, Darmstadt
Paraformaldehyd (reinst)	Merck, Darmstadt
Penecillin/Streptomycin (100 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Streptavidin <i>high capacity beads</i>	Pierce / Thermo Fisher Scientific, Bonn
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
TEMED (p.a.)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tetrazyklin-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka AG, Buchs, CH
Triton-X100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
TurboPfu Polymerase + 10 x Puffer	Stratagene / Agilent Technologies, Waldbronn
Tween-20	Sigma Aldrich, Steinheim

Alle weiteren Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Ambion (Austin, USA), Biorad (München, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma Aldrich (Steinheim).

3.1.3 Verwendete Kits

<i>BCATM Protein Assay Kit</i>	Pierce / Thermo Fisher, Waltham MA USA
<i>GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>PageBlueTM Protein Staining Solution</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Photoactive aminoacids (L-Photo-Leucine and L-Photo-Methionine)</i>	Pierce / Thermo Fisher Scientific, Bonn
<i>PureYieldTM Plasmid Midiprep System</i>	Promega GmbH, Mannheim
<i>SEC MW Calibration Kits</i>	GE Healthcare, München
<i>Western-Blotting Detection System ECL Plus & Advanced</i>	GE Healthcare, München

3.1.4 Fertiggele

NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gele 1,5mm 10 *well*

NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gele 1,5mm 15 *well*

NuPAGE® Novex 3-8% Tris-Acetat Gele 1,5mm 10 *well*

NuPAGE® Novex 7% Tris-Acetat Gele 1,5mm 10 *well*

NuPAGE®-MES SDS *Running Buffer* (20x)

NuPAGE®-MOPS SDS *Running Buffer* (20x)

NuPAGE®-Tris-Acetat SDS *Running Buffer* (20x)

Die verwendeten Fertiggele und dazugehörigen Laufpuffer wurden von der Firma Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt bezogen.

3.1.5 Software

Adobe Photoshop Elements	Adobe Systems GmbH, München
Adobe Reader X	Adobe Systems GmbH, München
DNASTAR Lasergene 8 (EditSeq / Seqman)	DNASTAR, Inc., Madison, WI USA
FV10-ASW 2.0 bzw. 3.0	Olympus, Hamburg
Gel Jet Imager (Intas GDS 1.51 01/2002)	Intas GmbH, Göttingen
Gen5 1.09	BioTek GmbH, Bad Friedrichshall
Microsoft Office 2007 und 2010	Microsoft Dt. GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Windows XP, Vista und 7	Microsoft Dt. GmbH, Unterschleißheim
Unicorn 5.11 Build407 2006	GE Healthcare, München

3.1.6 Online-Tools

http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/	Analyse von Restriktionsschnittstellen
http://www.expasy.ch/	
http://www.uniprot.org/	
http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html	Vorhersage von <i>coiled-coils</i>
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	
http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/	Vorhersage von N-Glykosylierungen
http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Vorhersage von Transmembrandomänen

3.1.7 Plasmide und Vektoren

Die als Insert verwendeten LIMP-2 Konstrukte wurden entweder selbst mittels PCR bzw. Fusions-PCR (siehe Abschnitt 3.2.1.1) und den entsprechenden *Primern* (siehe 3.1.8) hergestellt oder nach eigenem Design von der Firma Geneart, Regensburg bezogen. Nach Verdau der jeweiligen Inserts und des Zielvektors mit den entsprechenden

Restriktionsenzymen wurden Insert und Vektor mit einander ligiert (siehe Abschnitte 3.2.1.4 bis 3.2.1.6).

Die Richtigkeit aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurde per Sequenzierung überprüft (GATC Biotech AG, Konstanz). Die nachfolgende Tabellen liefern eine Übersicht der verwendeten Plasmide. Die Lagerung der Plasmide erfolgte in autoklaviertem dH₂O bei 4°C bzw. längerfristig bei -20°C.

Als eukaryotischer Expressionsvektor wurde zumeist auf pFROG zurückgegriffen. Der pFROG-Vektor wurde auf Basis des pCDNA3-Vektors (Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt), in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. T. Jentsch (damals ZMNH, Hamburg) von Herrn Dr. W. Günther hergestellt (Günther et al., 1998). Er dient als Expressionsvektor für die Transfektion von Säugetierzellen, wie zum Beispiel von MEF, HEK, Hela, CHO und COS-7-Zellen. Er enthält sowohl einen T7- als auch einen CMV- (Cytomegalie-Virus) Promotor, eine Ampicillinresistenz, das Polyadenalierungssignal des SV40-Virus (SV = *Simian Virus*) und in der Abwandlung, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde, ein c-terminales HA- (Hämagglutinin YPYDVPDYA) bzw. Myc-*Tag* (EQKLISEEDL).

Durch die Antibiotikaresistenz und den bakteriellen Replikationsursprung (ColE1) konnten die Plasmide im Mini- bzw. Midi-präparativen Maßstab in Bakterien amplifiziert werden. Das SV-40 Polyadenalierungssignal führte zur erforderlichen Prozessierung des 3'-Endes der mRNA. Der SV40-ori ermöglichte eine Replikation des Vektors in Säugetierzelllinien, die das SV40-T-Antigen exprimieren, wie dies zum Beispiel bei einigen der verwendeten MEF Zelllinien der Fall ist. Dabei ist durch das Vorhandensein mehrerer Kopien des Plasmids die Expression in Zellen, die über das SV40-T-Antigen verfügen, stärker als in anderen Zellen.

Für die Expression der codon-optimierten luminalen LIMP-2 Domäne (hLIMP-2_R77-Y440) (Geneart, Regensburg) im prokaryotischen System wurde auf den freundlicherweise von Herrn Dr. B. Spudy (Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Grötzinger; Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellten pET22b(+) Vektor (Novagene / Merck KGaA, Darmstadt) zurückgegriffen (siehe Abschnitt 3.2.1.8).

Der Expressionvektor pEFS_sighis1 wurde für die Expression der luminalen Domäne von LIMP-2 (hLIMP-2_A32-E420) im eukaryotischen Sekretions-Zellsystem eingesetzt (siehe Abschnitt 3.2.3.6). Der Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Dr. K. Büssow (AG Strukturuntersuchungen an Faktoren der Pathogenabwehr am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

In der Nomenklatur der Plasmide steht ‚m‘ für die murine Variante und ‚h‘ für die humane Sequenz der jeweiligen cDNA des *Inserts*.

3.1.7.1 Allgemeine Plasmide

Plasmid Name	Tag	Referenz / Quelle
pFROG_mLIMP-2_WT_Myc	c-term Myc	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
pFROG_mLIMP-2_WT_HA	c-term HA	eigene Herstellung
pFROG_hLIMP-2_WT_cterm_Myc	c-term Myc	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
pFROG_2xmLIMP-2_WT_Myc (Tandemmutante)	c-term Myc	eigene Herstellung
pET22b_hLIMP-2_luminal_codonoptimiert	ohne	eigene Herstellung; Geneart, Regensburg
pEFS_sighis1_hLIMP-2_A32-E420	c-term His	eigene Herstellung
pFROG_hGBA_WT	ohne	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
peGFP-N1	ohne	Clontech / Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

3.1.7.2 Glykosylierungsmutanten

Plasmid Name	Tag	Referenz / Quelle
pFROG_mLIMP-2_11xNA_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung; Geneart, Regensburg
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A45N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A68N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A105N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A122N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A206N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A224N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A249N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A304N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A325N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A412N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_11xNA_A430N_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N45Q_cterm_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N68Q_cterm_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N105Q_cterm_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N122Q_cterm_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N206Q_cterm_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N224Q_cterm_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N249Q_cterm_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N304Q_cterm_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N325Q_cterm_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung

Material und Methoden

pFROG_mLIMP-2_N412Q_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N430Q_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_N45/105/122/304/430Q	c-term Myc	eigene Herstellung; Geneart, Regensburg
pFROG_hLIMP-2_H363N_ctypeMyc	c-term Myc	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
pFROG_mLIMP-2_11xNA_H363N_ctypeMyc	c-term Myc	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
pFROG_hLIMP-2_D122N_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_T108N_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_Y388S_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung

3.1.7.3 Methioninmutanten

Plasmid Name	Tag	Referenz / Quelle
pFROG_mLIMP-2_demethioniert_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_5x_n-terminal_demeth_Myc	c-term Myc	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
pFROG_mLIMP-2_5x_c-terminal_demeth_Myc	c-term Myc	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
pFROG_mLIMP-2_demeth_I41M_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_demeth_I159M_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_demeth_I247M_Myc	c-term Myc	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
pFROG_mLIMP-2_demeth_I319M_Myc	c-term Myc	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
pFROG_mLIMP-2_demeth_I337M_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_demeth_I356M_Myc	c-term Myc	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
pFROG_mLIMP-2_demeth_I404M_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_demeth_I409M_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_demeth_I443M_Myc	c-term Myc	PD Dr. M.Schwake, CAU Kiel
pFROG_mLIMP-2_demeth_I464M_Myc	c-term Myc	eigene Herstellung

3.1.7.4 Cysteinmutanten

Plasmid Name	Tag	Referenz / Quelle
pFROG_mLIMP-2_C245A_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_C274S_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_C312A_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_C318S_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_C329S_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung
pFROG_mLIMP-2_5xCS_ctypeMyc	c-term Myc	eigene Herstellung; Geneart, Regensburg

3.1.8 Primer

Die verwendeten Klonierungs- und Sequenzierprimer wurden per EditSeq (DNASTAR Lasergene 8) designt und über Sigma-Aldrich als 100 µM Stammlösung bezogen. Zur Verwendung als Arbeitslösung wurde ein Aliquot der Stammlösung mit dH₂O auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt und kurzfristig bei 4°C oder längerfristig zusammen mit den Stammlösungen bei -20°C gelagert. Bei der Sequenzierung von Plasmiden mit T7 Promotor wurde auf den Standard-T7 Sequenzierprimer, der bei der GATC Biotech AG, Konstanz hinterlegt war, zurückgegriffen. In der Nomenklatur der Oligonukleotide steht ‚m‘ für die murine Variante und ‚h‘ für die humane DNA-Sequenz.

3.1.8.1 Sequenzierprimer

Bezeichnung	5‘-3‘ Sequenz
pFrog_hin	GAGAACCCACTGCTTACTGG
pFROG_rev	TTAGGAGCAGATACGAATGGC
mLIMP-2_seq1h	GCTGTCTCTGCTGCTGCTGG
mLIMP-2_seq1r	CTCGATCGTCTGGTCTACCGCC
mLIMP-2_seq2h	CCATGCTGAAAGCCTATCAGC
mLIMP-2_seq3h	CCCGAGGGAAACTGCATGGAC
pF3r	GAGACTCCATTCGGGTGTTCT
mLIMP-2_dCC_hin	CTGACCCTGTTTGTGATTCA
mLIMP-2_dCC_rev	TGAATCACAAACAGGGTCAG
mLIMP-2_BHI_mLIMP-2_hin	CGAACCGGATCCGGCAGATG
pTLN_seq_1h	GCAGAAGCTCAGAATAAACG
pFS&pEFFs_sighis_hin	cttgaagtcctattccgaag
pFS_sighis_PGK1_rev	ttcactgcattctagttgtgg
pEFFS_sighis_rev	aactagaaggcacagtcgagg

3.1.8.2 Klonierungsprimer

3.1.8.2.1 Allgemeine Primer

Bezeichnung	5'-3' Sequenz
BH1-MLIMP-2_h	CGGATCCATGGGCAGATGCTGCTTCTACA
mLIMP-2_Stopp_EcoR1_r	CCGAATTCTTAGGTTTCGTATGAGGGGTGCTCT
mLIMP-2_ncoI_r	CATGCCATGGAGGGTTCGTATGAGGGGTGCTC
mLIMP-2_NcoI_rev	acCCATGGagGGTTCGTATGAG
mLIMP-2_SfiI_rev	ctttGGCCGAGGCGGCCctGGTTCGTATGAGGGGTG
SfiI_mLIMP-2_h	ACggccattacggccGGATGGGCAGATGCTGCTTC
mLIMP-2_Stopp_SfiI_rev	GAggccgaggcggccTTAGGTTTCGTATGAGGGGT
mLIMP-2_SfiI_rev	GAggccgaggcggccGAGGTTTCGTATGAGGGGTGCT
BbsI_hLIMP-2_lum_hin	aGAAGACgtCTCCgctgtagaccagagt
hLIMP-2_lum_end_BbsI_rev	TgaagacTAgatgCAAAGTAGTGTTAATCAT
BsmBI_hLIMP-2_lum_hin	aCGTCTCaCTCCgctgtagaccagagt
hLIMP-2_lum_end_BsmBI_rev	TcgtctcAgatgCTCTTTATCAATGTGAAC

3.1.8.2.2 Cysteinmutanten

Bezeichnung	5'-3' Sequenz
mLIMP-2_C245A_hin	ACAGACACAgccAATATGATTAAC
mLIMP-2_C245A_rev	GTTAATCATATTggcTGTGTCTGT
mLIMP-2_C312A_hin	GCTGGCTTCgctATACCCGAGGGAAAC
mLIMP-2_C312A_rev	GTTTCCCTCGGGTATagcGAAGCCAGC
mLIMP-2_C274S_hin	TCAGACTTGtccAGGTCAGTACAT
mLIMP-2_C274S_rev	ATGTACTGACCTggaCAAGTCTGA
mLIMP-2_C318S_hin	GAGGGAAACtccATGGACTCA
mLIMP-2_C318S_rev	TGAGTCCATggaGTTTCCCTC
mLIMP-2_C329S_hin	ATCAGCATCtccAAGAATGGTGCA
mLIMP-2_C329S_rev	TGCACCATTCTTggaGATGCTGAT

3.1.8.2.3 Methioninmutanten

Bezeichnung	5'-3' Sequenz
mLIMP-2_I41M_hin	CGATCGAGAAGAATatgGTATTACA
mLIMP-2_I41M_rev	TGTAATACcatATTCTTCTCGATCG
mLIMP-2_I159M_hin	AGCTTATCGAAGCCatgCTGAAAGC
mLIMP-2_I159M_rev	GCTTTCAGcatGGCTTCGATAAGCT
mLIMP-2_I337M_hin	CACCCATTATCatgTCTTTCCCACA
mLIMP-2_I337M_rev	TGTGGGAAAGAcataGATAATGGGTG

Material und Methoden

mLIMP-2_I404M_hin	TCAGGACTatgGTTTTCCCAGTGAT
mLIMP-2_I404M_rev	ATCACTGGGAAACcatAGTCCTGA
mLIMP-2_I409M_hin	CCAGTGatgTATCTCAATGAGAGTG
mLIMP-2_I409M_rev	CACTCTCATTGAGATAcatCACTGG
mLIMP-2_I464M_hin	GTCTatgGATGAGGGAAGTGCAGAT
mLIMP-2_I464M_rev	ATCTGCAGTTCCTCATCcatAGAC

3.1.8.2.4 Glykosylierungsmutanten

Bezeichnung	5'-3' Sequenz
mLIMP-2_A45N hin	TATGGTATTACAAaatGGCACCAAGG
mLIMP-2_A45N rev	CCTTGGTGCCattTTGTAATACCATA
mLIMP2_A68N hin	TTCTTCaatGTCACCAATCCTGAG
mLIMP2_A68N rev	CTCAGGATTGGTGACattGAAGAA
mLIMP-2_A105N_h	GTTTGGAGAAAATGGAACAACCTATATCTGC
mLIMP-2_A105N_r	GCAGATATAGTTGTTCCATTTTGTCCAAAC
mLIMP-2_A122N_h	GTTTTTGAACGAAACCAATCTGTT
mLIMP-2_A122N_r	AACAGATTGGTTTTCGTTCAAAAAC
mLIMP-2_A206N hin	CTATGAGAGAAatGGAACG
mLIMP-2_A206N rev	CGTTCCattTCTCTCATAG
mLIMP-2_A224N hin	CCTTaacTTTTCAAAAATCGTG
mLIMP-2_A224N rev	CACGATTTTTGAAAAgttAAGG
mLIMP-2_A249N hin	CATGCAATATGATTaacGGGACAG
mLIMP-2_A249N rev	CTGTCCCgttAATCATATTGCATG
mLIMP-2_A304N hin	GCAGAAATACTAGCCaacACCTCCG
mLIMP-2_A304N rev	CGGAGGTgttGGCTAGTATTTCTGC
mLIMP-2_A325N_h	GTGTTGAACATCAGCATCTGCAAG
mLIMP-2_A325N_r	CTTGCAGATGCTGATGTTCAACAC
mLIMP-2_A412N hin	CAGTGATGTATCTCaatGAGAGTG
mLIMP-2_A412N rev	CACTCTCattGAGATACATCACTG
mLIMP-2_A430N_h	GTGATTAACACGACTTTGGTTGTC
mLIMP-2_A430N_r	GACAACCAAAGTCGTGTTAATCAC
mLIMP-2_N45Q hin	TATGGTATTACAAcagGGCACCAAGG
mLIMP-2_N45Q rev	CCTTGGTGCCctgTTGTAATACCATA
mLIMP-2_N68Q hin	TTCTTCcagGTCACCAATCCTGAG
mLIMP-2_N68Q rev	CTCAGGATTGGTGACctgGAAGAA
mLIMP-2_N105Q hin	GTTTGGAGAAcaaGGAACAACCTATATCTGC

Material und Methoden

mLIMP-2_N105Q_rev	GCAGATATAGTTGTTCCttgTTCTCCAAAC
mLIMP-2_N122Q_hin	GAACGAcaaCAATCTGTTGGAGAT
mLIMP-2_N122Q_rev	ATCTCCAACAGATTGttgTCGTTC
mLIMP-2_N206Q_hin	CTATGAGAGAcagGGAACG
mLIMP-2_N206Q_rev	CGTTCCctgTCTCTCATAG
mLIMP-2_N224Q_hin	CCTTcagTTTTCAAAAATCGTG
mLIMP-2_N224Q_rev	CACGATTTTTGAAAActgAAGG
mLIMP-2_N249Q_hin	CATGCAATATGATTcaaGGGACAG
mLIMP-2_N249Q_rev	CTGTCCCttgAATCATATTGCATG
mLIMP-2_N304Q_hin	GCAGAAATACTAGCCcagACCTCCG
mLIMP-2_N304Q_rev	CGGAGGTctgGGCTAGTATTTCTGC
mLIMP-2_N325Q_hin	GTGTTGcaaATCAGCATCTGCAAG
mLIMP-2_N325Q_rev	CTTGACAGATGCTGATttgCAACAC
mLIMP-2_N412Q_hin	CAGTGATGTATCTCcagGAGAGTG
mLIMP-2_N412Q_rev	CACTCTCctgGAGATACATCACTG
mLIMP-2_N430Q_hin	GTGATTcaaACGACTTTGGTTGTC
mLIMP-2_N430Q_rev	GACAACCAAAGTCGTttgAATCAC
mLIMP-2_T108N_hin	GGAACAaatATATCTGCTGTCACC
mLIMP-2_T108N_rev	GGTGACAGCAGATATattTGTTCC
mLIMP-2_Y388S_hin	AACACTagcGTTAGGAAACTGGAT
mLIMP-2_Y388S_rev	ATCCAGTTTCCTAACgctAGTGTT
mLIMP-2_H363Q_hin	GAGcaaGAGTCGTTTGTGGACATT
mLIMP-2_H363Q_rev	AATGTCCACAAACGACTCttgCTCTTC

3.1.9 Synthetische LIMP-2 Peptide

Die beiden humanen LIMP-2 Peptide (s.u.) wurden von der Firma Firma JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin bezogen. Die Synthesemassstab lag bei jeweils 20mg mit einer Reinheit von > 95% (HPLC-220 nm) und mit Trifluoracetat als Gegenion. Eins der Peptide verfügte am N-terminalen Ende über ein Biotin-Tag, das über einen hydrophilen *Linker* (Ttds-*Linker* C₁₄H₂₈N₂O₆: *N*-(3-{2-[2-(3-Amino-propoxy)-ethoxy]-ethoxy}-propyl)-succinamic acid) (Abbildung 3.1-1) an das Peptid gekoppelt ist. Über den Biotin-Tag konnte dieses Peptid an Streptavidin-Agarose *Beads* gebunden werden.

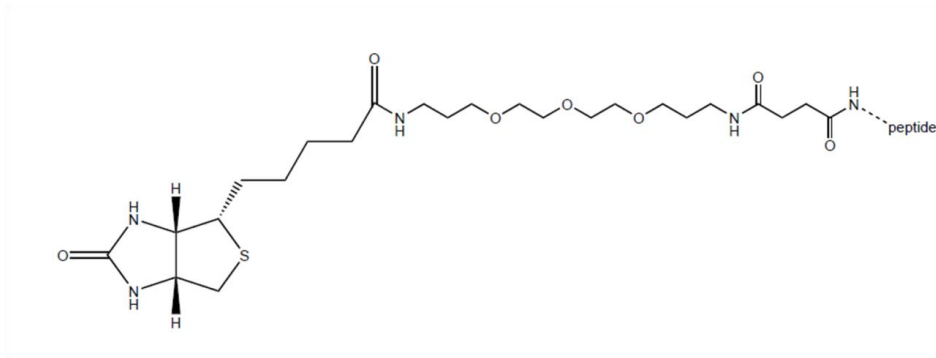


Abbildung 3.1-1: Struktur des Biotin-Tags mit Ttds-*Linker*.

Bezeichnung	Sequenz	
LIMP-2_L152-V173	LREIIEAMLKAYQQKLFVTHTV	2673,22 g/mol pI 8,76
Biotin_Ttds-LIMP-2_L152-E175	LREIIEAMLKAYQQKLFVTHTVDE	3404,04 g/mol Peptid 2876,35 g/mol pI 5,63

3.1.10 Zelllinien

Die verschiedenen Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C, in 5 %iger CO₂ Atmosphäre mit 95 % Luftfeuchtigkeit in DMEM *High Glukose* + 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin kultiviert (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Die Kultivierung der HEK293-6E Suspensionszellen zur Expression der luminalen Domäne von LIMP-2 ist im Abschnitt 3.2.3.6 beschrieben.

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
LIMP-2 ^{-/-} MEF (E5)	Murine embryonale Fibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV40 T-Antigen, LIMP-2-defizient	Reczek et al., 2007.
WT MEF (PS1 ^{+/+})	Murine embryonale Fibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV40 T-Antigen, Wildtyp	Reczek et al., 2007.
LIMP-2 ^{-/-} MEF (383-2)	Primäre murine embryonale Fibroblasten, LIMP-2-defizient	Dr. J. Schröder, Kiel Blanz et al., 2010
WT MEF (383-3)	Primäre murine embryonale Fibroblasten, Wildtyp	Dr. J. Schröder, Kiel Blanz et al., 2010
β-GC ^{-/-} MEF	Primäre murine embryonale Fibroblasten, β-GC-defizient	Dr. E. Sidransky, NIH Bethesda, MD USA
COS-7	Nieren-Fibroblasten aus der afrikanischen Grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethops</i> , immortalisiert mit dem großen SV40 T-Antigen.	ATCC / DSMZ, etablierte Zelllinie
Hela	Humane epithelartige Zelllinie aus einem Zervix-Karzinom. Die Zelllinie ist mit dem Papilloma Virus Typ 18 (HPV-18) infiziert.	ATCC / DSMZ, etablierte Zelllinie
HEK293	Humane primäre embryonale Nierenzelllinie Adenovirus Typ 5 (Ad 5) transformiert.	ATCC / DSMZ, etablierte Zelllinie
HEK293-6E	HEK293E Suspensionszelllinie (Meissner et al., 2001) exprimiert das Epstein-Barr Virus (EBV) nukleare Antigen 1 (EBNA1)	Dr. K. Büsow, HZI Braunschweig
CHO-K1	<i>Chinese hamster ovary</i> Subklon Zelllinie	ATCC / DSMZ, etablierte Zelllinie

3.1.11 Antikörper

3.1.11.1 Primäre Antikörper

Name (Klon)	erzeugt in	gerichtet gegen	IF- Verd.	WB- Verd.	IP- Verd.	Referenz / Quelle
Anti-Actin (A-2066)	Kaninchen	Actin		1:3000		Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-HA (3F10)	Ratte	HA-Tag YPYDVPDYA	1:200	1:1000 – 1:500		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-HIS	Maus	His-Tag HHHHHH		1:2000		Dianova GmbH, Hamburg
Anti-KDEL (10c3)	Maus	KDEL Sequenz	1:250			Stressgen / Enzo Life Sciences, Lörrach
Anti-LAMP-1 (1D4B)	Ratte	murin LAMP-1	1:50	1:500		DSHB, Iowa City, USA
Anti-LAMP-1 (H4A3)	Maus	human LAMP-1	1:50	1:1000		DSHB, Iowa City, USA
Anti-LAMP-2 (Abl93c)	Ratte	murin LAMP-2		1:1000		Abcam plc, Cambridge, CB4 0FL, UK
Anti-LIMP-2 (Tier 1 o. 2 90. Tag)	Kaninchen	human / murin LIMP-2	1:750	1:1000	1:100	M. Schwake, AG Saftig, CAU Kiel über Pineda
Anti-Myc (9B11)	Maus	cMyc-Tag EQKLISEEDL	1:500	1:1000	1:150 1:500	Cell Signaling, Millipore, Schwalbach
Anti-Myc (A-14)	Kaninchen	cMyc-Tag EQKLISEEDL	1:250			Santa Cruz, Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Anti-PDI (H160)	Kaninchen	humane / murine Protein Disulfid Isomerase	1:50			Santa Cruz, Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Anti-β-GC (1341/1331)	Kaninchen	murin β-GC	1:250 - 1:100	1:1000		D. Reczek, USA
Anti-β-GC (8E4)	Maus	human β-GC	1:250	1:2000		Hans Aerts, Med. Biochem. Amsterdam
Anti-β-GC (Peptid 11) Tier1	Kaninchen	human β-GC		1:1000		M. Schwake, AG Saftig, CAU Kiel über Pineda

3.1.11.2 Sekundäre Antikörper

Name	erzeugt in	gerichtet gegen	IF-Verd.	WB-Verd.	Referenz / Quelle
Anti-Kaninchen Alexa <i>green</i> 488	Ziege	Kaninchen IgG	1:300		Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen Alexa <i>red</i> 594	Ziege	Kaninchen IgG	1:300		Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus Alexa <i>green</i> 488	Ziege	Maus IgG	1:300		Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus Alexa <i>red</i> 594	Ziege	Maus IgG	1:300		Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Ratte Alexa <i>green</i> 488	Ziege	Ratten IgG	1:300		Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Ratte Alexa <i>green</i> 594	Ziege	Ratten IgG	1:300		Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen-HRP	Schaf	Kaninchen IgG		1:10000	Dianova GmbH, Hamburg
Anti-Maus-HRP	Schaf	Maus IgG		1:10000	Dianova GmbH, Hamburg
Anti-Ratte-HRP	Schaf	Ratten IgG		1:10000	Dianova GmbH, Hamburg

3.1.12 Puffer

3.1.12.1 Allgemeine Puffer

Das Ansetzen der Standard Puffer und das Einstellen der pH-Werte erfolgte nach den Protokollen im 5. Kapitel „*Preparing Buffers and Media*“ der Roche Lab FAQs (4th Edition). Destilliertes Wasser (dH₂O) wurde mit der Millipore Anlage MilliQ Plus (Millipore, Schwalbach) aus dem hauseigenem vollentsalzten Wasser (VE-Wasser) hergestellt. Diese wurde dann entweder direkt verwendet, oder aber steril filtriert, bzw. als 1,5 ml Aliquots in Reaktionsgefäßen autoklaviert.

0,1 M NaPhosphat Puffer pH7,0 Stock	195 ml 0,2 M NaH ₂ PO ₄ (27,6 g NaH ₂ PO ₄ ·1H ₂ O in 1 L dH ₂ O) 305 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ (35,6 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O in 1 L dH ₂ O) 500 ml dH ₂ O
0,5 M NaPhosphat Puffer pH7,0 Stock	1 M NaH ₂ PO ₄ (48,75 ml) 1 M Na ₂ HPO ₄ (76,25 ml) 125 ml dH ₂ O

Material und Methoden

0,1 M NaAcetat Puffer pH5,0 Stock	<p>148 ml 0,2 M Essigsäure (11,55 ml Eisessig (17,5 M) in 1 L dH₂O)</p> <p>352 ml 0,2 M NaAcetat (27,21 g NaAcetat-3H₂O (M 136,08) in 1 L dH₂O)</p> <p>500 ml dH₂O</p>
10 x PBS (steril RT)	<p>1,37 M NaCl</p> <p>27 mM KCl</p> <p>20 mM KH₂PO₄</p> <p>100 mM Na₂HPO₄·2H₂O</p> <p>pH 6,8</p>
LB-Agar	<p>10 g Bacto-Trypton</p> <p>5 g <i>Bacto-yeast-Extrakt</i></p> <p>10 g NaCl</p> <p>15 g/L Bacto-agar</p> <p>ad 1000 ml dH₂O</p> <p>pH 7,0</p>
LB-Medium (steril 4°C)	<p>10 g Bacto-Trypton</p> <p>5 g <i>Bacto-yeast-Extrakt</i></p> <p>10 g NaCl</p> <p>ad 1000 ml dH₂O</p> <p>pH 7,4</p>
50 x TAE-Puffer (RT)	<p>2 M Tris (242 g)</p> <p>2 M Eisessig (57.1 ml)</p> <p>100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0-8,5)</p> <p>ad 1000 ml dH₂O</p>
EBC-Lysispuffer (4°C)	<p>50mM Tris</p> <p>120mM NaCl</p> <p>0,5% NP40</p> <p>mit HCl auf pH 7,4</p> <p>Complete frisch</p>
Einfriermedium	<p>20% DMSO (steril)/DMEM 10%FCS; P/S</p>

3.1.12.2 Crosslink Puffer

DSS- <i>Crosslink</i> -Erntepuffer (4°C)	25mM HEPES / EBSS pH 7,4 steril Complete frisch
DSS-Waschpuffer	25mM HEPES / EBSS mit 10M NaOH auf pH 7,4 einstellen Steril filtrieren
DSS- <i>Stock</i> -Lösung	54,3mM DSS in DMSO 2 mg (no weigh format) DSS 100 µl DMSO steril
DSS- <i>Crosslink</i> -Lösung	0,54mM DSS / DMSO in 25mM HEPES / EBSS pH 7,4 steril
DSS-Kontroll-Lösung	0,5 % DMSO in 25mM HEPES / EBSS pH 7,4 steril
DSS-Stopp-Lösung	20mM Ethanolamin in 25mM HEPES / EBSS pH 7,4 steril
BS ³ - <i>Stock</i> -Lösung	10mM BS ³ in dH ₂ O 2 mg (no weigh format) BS ³ 349 µl dH ₂ O steril
BS ³ -Stopp-Lösung	1 M Tris/HCl pH 7,5

3.1.12.3 Deglykosylierungs-Puffer

EndoH-Puffer-I (-20°C)	100mM Natriumacetat 1% SDS pH5,5 mit Essigsäure eingestellt Complete frisch
EndoH-Puffer-II (-20°C)	EndoH-Puffer-I 0,1% Mercaptoethanol Complete frisch
PNGaseF-Puffer-I (-20°C)	50 mM NaP Puffer pH 7,8 1% SDS Complete frisch
PNGaseF-Puffer-II (-20°C)	50 mM NaP Puffer pH 7,5 1% NP40 Complete frisch

3.1.12.4 Enzymassay Puffer

β-GC-Enzymassay: Citratpuffer	0,2 M Citronensäure 0,4% BSA 0,08% NaN ₃ pH Wert auf 4,6 einstellen Lagerung 4°C
β-GC-Enzymassay: Stopplösung	0,4 M Glycin pH Wert mit NaOH auf pH 10,4 einstellen
β-GC-Enzymassay: Substrat	10 mM 4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside (Sigma-Aldrich N7006) 0,2 M Citratpuffer pH 4,6

3.1.12.5 Immunfluoreszenz Puffer

Blockierungspuffer 1	0,12% Glycin, 0,2% Saponin / PBS
Blockierungspuffer 2	3% BSA, 0,2% Saponin / PBS
DABCO-Stammlösung	200 mg/ml Diazobicyclooctan in 1 x PBS
Einbettungsmedium	1 ml Mowiol 100 µl DABCO 1 µl DAPI
Fixierpuffer	4% Paraformaldehyd [PFA]
Mowiol	10 g Mowiol in 40 ml PBS 24 h bei RT rühren 20 ml 100%iges Glycerol zugeben, 24 h bei RT rühren, pH-Kontrolle (pH 6-7) 15 min bei 12000 rpm zentrifugieren; Lagerung bei – 20 °C, nur 1-2 x auftauen
4% Paraformaldehyd [PFA] (-20°C)	4 g PFA 100 ml 1 x PBS erhitzen auf 80°C, abkühlen auf RT, pH 7,4
Permeabilisierungspuffer	0,2% Saponin / PBS

3.1.12.6 NMR-Puffer

50 mM deut. NaAcetat Puffer / 7% D₂O

143 µl deuterierte Essigsäure (17,5 M;
C₂D₄O₂ Riedel-de Haën 09013)
+49 ml dH₂O
eingestellt durch Zugabe von 300 µl 2,5 M
NaOH auf pH5
→ 930 µl 50 mM deut. NaAcetat Puffer
pH5
+70 µl D₂O (Campro Scientific CS01-
20092087)
= 1000 µl 50 mM NaAcetat Puffer / 7%
D₂O pH5

3.1.12.7 SDS-PAGE und Western-Blot Puffer

Blockpuffer *Western-Blot* (frisch)

5% Milchpulver
1 x TBS/T

10 x SDS-Elektrodenpuffer (RT)

1,92 M Glycerin
250 mM Tris
35 mM SDS

SDS-Sammelgelpuffer (RT)

500mM Tris
0,4% SDS
pH 6,8

SDS-Trenngelpuffer (RT)

1500mM Tris
0,4% SDS
pH 8,8

4 x Solubilisierungspuffer nicht red. (-20°)
(Lämmli)

40% Glycerin
4% SDS
500 mM Tris pH 6,8
0,02% Bromphenolblau

4 x Solubilisierungspuffer red. (-20°C)
(Lämmli)

4 x Solubilisierungspuffer nicht red.
400 mM DTT

10 x TBS (RT)

150 mM NaCl
25 mM Tris
pH 7,4

Material und Methoden

TBS/Tween (RT)	1 ml Tween-20 ad 1000 ml 1 x TBS
10 x Transferpuffer <i>SemiDry</i> (RT)	1920 mM Glycin 250 mM Tris pH 8,6
1 x Transferpuffer <i>SemiDry</i> (RT)	192 mM Glycin 25 mM Tris 10% (v/v) Methanol pH 8,4-9,0
10 x Transferpuffer <i>Tank-Blot</i> (RT)	250 mM Tris (30,27 g) 2 M Glycin (144 g) ad 2000 ml dH ₂ O pH 8,3
1 x Transferpuffer <i>Tank-Blot</i> (4°C)	200 ml 10 x <i>Tank-Blot</i> -Puffer 400 ml Methanol ad 2000 ml dH ₂ O

3.1.13 Zellkulturmedium

Dulbecco's Modified Eagle Medium
(DMEM) *High Glukose* (4.5 g/ml)

PAA Laboratories GmbH, Pasching, A

Dulbecco's Modified Eagle's Limiting
Medium Minus L-Leucine and L-
Methionine DMEM-LM

Pierce / Thermo Fisher Scientific, Bonn

3.1.14 Bakterienstämme

Der *Escherichia coli* (E.coli) Stamm *XL1-blue Escherichia coli* (Stratagene / AgilentTechnologies, Waldbronn), eine Variante des Sicherheitsstammes K12, diente als Klonierungs- und Plasmidamplifikationsorganismus.

XL1-Blue-Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)] (Bullock et al., 1987).

Der zur Expression der luminalen Domäne von LIMP-2 verwendete E.coli Stamm BL21 (DE3)pLysS wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Grötzinger; Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verfügung gestellt.

BL21 (DE3)pLysS-Genotyp: *E. coli* B F⁻ dcm ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) gal λ(DE3)[pLysS Cam^r] (Weiner et al., 1994).

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

3.2.1.1.1 Standard-PCR

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten LIMP-2 Expressionskonstrukte wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt. Generell können mit einer PCR durch Zuhilfenahme von kurzen Oligonukleotiden (sogenannten *Primern*) definierte DNA-Sequenzen *in vitro* amplifiziert werden. Die spezifischen *Primer* lagern sich über komplementäre Basenpaarungen an die Matrizen-DNA an. Der Vorwärts-*Primer* bindet an den kodierenden Strang und der Rückwärts-*Primer* an den nicht kodierenden Strang. Die Synthese erfolgt in 5' → 3'-Richtung.

Folgende drei Grundschrte einer PCR wurden zyklisch 35 oder 40mal wiederholt und führten somit zur exponentiellen Vermehrung der durch die *Primer* flankierten DNA-Sequenz:

Durch Hitze-Denaturierung bei einer Temperatur von 95°C wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge getrennt.

Im anschließenden *Annealing* Prozess wird aufgrund der Temperaturniedrigung auf ein Niveau von 55°C, welches knapp 5°C unter der niedrigsten *Primer*-Schmelztemperatur liegt, die spezifische Hybridisierung der *Primer* an die *Template* DNA initiiert.

Während der Elongationphase wird letztendlich dann bei 72°C die DNA durch die DNA-Polymerase (TurboPfu, Stratagene) synthetisiert. Die Dauer der Elongationsphase wird zum einen durch die Länge des Amplifikats und zum anderen durch die jeweils eingesetzte Polymerase bestimmt.

Mit Hilfe dieser klassischen Form der PCR wurden v.a. Restriktionsschnittstellen am Ende und am Anfang eines Konstrukts generiert. Ein typischer 50 µl Ansatz und das dazugehörige Temperaturprofil sahen wie folgt aus:

Tabelle 3.2-1: Pipettierschema (links) und Temperaturprofil (rechts) einer Standard-PCR.

5 µl <i>Template</i> -DNA [10 ng/µl]	Temperatur	Zeit	Zyklen
5 µl 10 x <i>TurboPfu</i> -Puffer	95°C	5 min	
4 µl dNTP-Mix [je 2mM]	95°C	30 sec	35x
2,5 µl DMSO	55°C	30 sec	
2 µl <i>forward-Primer</i> [10 µM]	72°C	30 sec - 3 min	
2 µl <i>reverse-Primer</i> [10 µM]	72°C	10 min	
29 µl dH ₂ O	10°C	∞	
0,5 µl <i>TurboPfu</i> -Polymerase [2,5U/µl]			

3.2.1.1.2 Fusions-PCR

Für die Mutagenese, dem Einführen von z.B. Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen auf cDNA Ebene, wurde auf eine abgewandelte Form der PCR, die zweistufige Fusions-PCR zurückgegriffen.

Im ersten Schritt wurden in zwei separaten PCR-Ansätzen gemäß Standardprotokoll (s.o.) zwei sich zum Teil überlappende cDNA-Fragmente mit jeweils einem genspezifischen *Primer* und einem *Mutageneseprimer* hergestellt. Die genspezifischen *Primer*, auch äußere *Primer* genannt, enthielten die für eine Ligation in linearisierte Plasmidvektoren nötigen Restriktionserkennungssequenzen. Die zueinander komplementären *Mutageneseprimer*, auch als innere *Primer* bezeichnet, das zu mutierende Motiv. Nach Auftrennung per Agarosegelelektrophorese und Reinigung aus dem Gel, wurden diese beiden Fragmente, die sich in der Sequenz der inneren *Primer* überlappten in einer zweiten PCR-Stufe als *Templates* verwendet.

In dieser zweiten PCR kam es im Bereich der Überlappung zum *Reannealing* der beiden Stränge und die Gesamtsequenz ließ sich dann über die beiden äußeren *Primer* amplifizieren. Nach erneuter Agarose-Gelelektrophorese wurde das finale PCR-Produkt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen am 5' und 3' Ende geschnitten und in einen entsprechend linearisierten Vektor inseriert.

Das *Primerdesign* wurde generell mit Hilfe der implementierten *EditSeq*-Funktion des Programms *DNASTAR* durchgeführt.

Tabelle 3.2-2: Pipettierschema (links) und Temperaturprofil (rechts) der zweiten Stufe bei der Fusions-PCR.

Je 7 µl <i>Template</i> -DNA Fragment I und II	Temperatur	Zeit	Zyklen
5 µl 10 x <i>TurboPfu</i> -Puffer	95°C	5 min	
4 µl dNTP-Mix [je 2mM]	95°C	30 sec	40x
2,5 µl DMSO	54°C	30 sec	
2 µl <i>forward-Primer</i> [10 µM]	72°C	2 - 3 min	
2 µl <i>reverse-Primer</i> [10 µM]	72°C	10 min	
20 µl dH ₂ O	10°C	∞	
0,5 µl <i>TurboPfu</i> -Polymerase [2,5U/µl]			

3.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmente nach ihrer Größen aus PCR oder Restriktionsverdau Ansätzen, sowie der Reinigung der DNA von Enzymen und Puffern wurden die Ansätze einer Agarose-Gelelektrophorese unterworfen.

Die Trennung fand dabei in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 120 V für 30 bis 35 Minuten mit 1 x TAE-Puffer als Laufmittel statt.

Der Agaroseanteil im Agarosegel lag je nach Fragestellung und Fragmentgröße bei 1% oder 2%. Zusätzlich wurden die Gele mit 1%iger Ethidiumbromid-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG) in einer Endkonzentration von 0,8 µg/ml versehen, um die aufgetrennte DNA durch interkaliertes Ethidiumbromid unter UV-Licht als Banden sichtbar machen zu können. Vor dem Auftragen wurden die aufzutrennenden DNA-Proben mit Auftragspuffer (6x *Loading Dye*, Fermentas) im Verhältnis 10:1 versetzt. Das Gesamt-Auftragsvolumen betrug bei PCR- und Restriktionsverdau-Ansätzen für Klonierungen 55 µl und bei Kontrollverdau-Ansätzen von Plasmid-DNA aus Mini- oder Midi-Präparationen 20 µl.

Als Größenstandard diente der *GeneRuler 1kb* oder der *GeneRuler 100bp-plus-Marker* der Firma Fermentas. Die Dokumentation erfolgte mit dem *Gel Jet Imager UV System* der Firma Intas durch Beleuchtung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 312 \text{ nm}$, entweder direkt nach dem Gellauf oder aber nach Ausschneiden der entsprechenden DNA Fragmentbanden, falls mit diesen weitergearbeitet werden sollte.

3.2.1.3 Reinigung von cDNA aus Agarosegelen

Die DNA-Banden von PCR- oder Restriktionsverdau-Produkten wurden nach der Agarose-Gelelektrophorese und vor der Dokumentation (s.o.) unter UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Ihre Reinigung wurde gemäß Herstellerangaben mit Hilfe des *High Pure PCR Purification Kits* der Firma Roche durchgeführt. Die Lagerung der gereinigten und in dH₂O eluierten DNA erfolgte kurzfristig bei 4°C oder langfristig bei -20°C.

3.2.1.4 Restriktionsverdau

Vor ihrer Expression mussten die in der PCR amplifizierten cDNA-Konstrukte in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert werden. Dies galt auch für Fragmente, die aus einem Klonierungsvektor umkloniert werden sollten. Dazu wurden sowohl das gereinigte PCR-Produkt bzw. das Fragment enthaltene Plasmid, als auch der entsprechende Vektor mit den jeweiligen Typ-II-Restriktionsendonukleasen linearisiert bzw. geschnitten. Diese Enzyme hydrolysieren DNA an ihren spezifischen palindromischen Erkennungssequenzen und erzeugen so linearisierte Produkte mit klebrigen (*sticky ends*) oder glatten (*blunt ends*) Enden.

Das Endvolumen der jeweiligen Reaktion betrug 50 µl. Für den Vektor- und Plasmidverdau wurden je 2,5 µg DNA in einem Ansatzvolumen von 50 µl verwendet. Der Verdau erfolgte dann für 2 bis 8 Stunden bei 37°C schüttelnd im Thermomischblock. Für den Verdau eines PCR-Produktes (*Insert*) wurden 43 µl Eluat aus der Reinigung (s.o.) eingesetzt und der Verdau über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln im Thermomischblock durchgeführt. Alle Enzyme [10 U/µl] und Puffer [10 x] wurden von der Firma Fermentas bezogen und gemäß deren Angaben eingesetzt, wobei die minimale Enzymmenge für einen 50 µl Ansatz bei 5 U lag (vgl. <http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>). Die Restriktionsreaktion wurde nicht durch Hitzeinaktivierung gestoppt, sondern mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.1.2) beendet.

3.2.1.5 Dephosphorylierung

Um eine Rezirkulation der mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektoren während der Ligation zu verhindern, wurden diese durch Zugabe von 2 µl alkalischer Phosphatase (FastAP [1 U/µl], Fermentas) je 50 µl Ansatz dephosphoryliert. Die Inkubation erfolgte für 15 bis 20 Minuten bei 37°C im Thermomischblock. Anschließend wurde die Phosphatase für 10 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert. So behandelte Vektoren wurden langfristig bei -20° gelagert.

3.2.1.6 Ligation

Das *Insert* und der dephosphorylierte linearisierte Vektor wurden in einem 10 µl Reaktionsansatz, bestehend aus 7 µl *Insert* (bzw. Wasser beim Kontrollansatz), 1 µl 10xLigasepuffer, 1 µl Vektor-DNA-Lsg. [0,05 µg/µl], sowie 1 µl T4-DNA-Ligase ([1 U/µl] Fermentas), ligiert. Die Reaktion wurde über Nacht bei 17°C im Wasserbad inkubiert. Vor der sich anschließenden Transformation wurde die Ligasereaktion durch eine zehnminütige Hitzeinaktivierung bei 65°C gestoppt und danach auf 4°C herunter gekühlt. Schloss sich eine Transformation nicht sofort an, erfolgte eine kurzfristige Lagerung der Ansätze bei 4°C.

3.2.1.7 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die Herstellung von elektrokompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen war ein dreitägiger Prozess.

Am ersten Tag wurde unter Verwendung einer sterilen Impföse aus einem *Glycerolstock* *E. coli* Zellen des Stammes *XL-1 blue* (siehe Abschnitt 3.1.14) auf einer zuvor mit 50 µl Tetrazyklin ([20 mg/ml] = 1 mg) beschichteten LB-Platte fraktioniert ausgestrichen und für etwa 15 Stunden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Des Weiteren wurden 2 Liter dH₂O und 1 Liter LB-Medium sowie eine 250 ml Schottflasche steril autoklaviert.

Am nächsten Tag wurde ein Klon von der Übernacht-Platte gepickt und damit eine 50 ml-LB/Tetrazyklin-Vorkultur (50 µl [20 mg/ml] Tetrazyklin/ 50 ml LB-Medium = 20 µg/ml Tetrazyklin) angeimpft. Diese Vorkultur wurde dann für 15 Stunden über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 250 upm inkubiert. Auch wurden 200 ml einer sterilen 10%igen Glycerinlösung vorbereitet, indem 176,8 ml dH₂O mit 23,25 ml 86%igem Glycerin versetzt und in die sterile 250 ml Schottflasche 0,2 µm steril filtriert wurden und zusammen mit dem Wasser vom ersten Tag bei 4°C kaltgestellt.

Am dritten Tag wurde mit 20 ml der Vorkultur 1 Liter des vorgewärmten LB-Mediums vom ersten Tag ohne Antibiotika-Zusatz in einem 2 Liter Schüttelkolben inokuliert und die OD₆₀₀ gemessen und zusammen mit dem Zeitpunkt der Probenahme protokolliert. Der OD₆₀₀-Wert lag bei < 0,1. In der folgenden in etwa 4 Stunden dauernden Inkubation bei 37°C wurde die Bakteriensuspension bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 schüttelnd herangezogen. Währenddessen wurde eine J2-HS Zentrifuge (Beckmann) zusammen mit einem JA14 Rotor auf etwa 4°C herunter gekühlt. Nach Zentrifugieren (4 x 250 ml; 15 Minuten bei 5000 upm und 4°C) wurden die Bakterienpellets mit je 10 ml eiskaltem dH₂O resuspendiert, je zwei Ansätze zusammengeführt und auf 250 ml aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (s.o.) wurden die Pellets nochmals mit dH₂O gewaschen und die beiden sich dann ergebenden Pellets in je 10 ml sterilfiltrierter, eiskalter 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde jeweils in 50 ml Sarstedtröhrchen überführt und mit der Glycerin-Lösung aufgefüllt. Nach einer abschließenden Zentrifugation bei 4°C und 3200 upm für 20 Minuten (Multifuge 3SR+, Heraeus) wurden die Pellets in je 2 ml Glycerin-Lösung aufgenommen, zu 50 µl Aliquots auf Trockeneis in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorfgefäße) portioniert und bei -80°C eingefroren.

3.2.1.8 Transformation von *E. coli* Zellen

Die Transformation der elektrokompente *E. coli* *XL1-blue* Zellen (siehe Abschnitt 3.2.1.7) mit dem inaktivierten Ligationsansatz (siehe Abschnitt 3.2.1.6) erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden die elektrokompenten Zellen etwa 10 Minuten auf Eis aufgetaut und danach je 1 μ l Ligationsansatz mit 50 μ l Bakteriensuspension gemischt. Anschließend wurde der Transformationsansatz in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt, dabei ist darauf zu achten gewesen, dass sich keine Luftblasen bilden, da diese zu einem Kurzschluss führen würden. Mit dem *Gene Pulser* der Firma Biorad wurde mit einer Spannung von 2,5 kV, bei einer Kapazität von 25 μ F und einem Widerstand von 400 Ω die Zellen elektroporiert. Die „Schußzeiten“ lagen bei 8,6 bis 9 ms. Nach Aufnahme des Ansatzes mit 1 ml vorgewärmtem antibiotikafreien LB-Medium und Überführen in ein Eppendorfgefäß wurde dieser bei 37°C für 30 Minuten schüttelnd inkubiert. Das Ausplattieren auf je nach Resistenzmarker mit entsprechenden Antibiotika versehenden LB-Platten erfolgte nach Zentrifugation bei 6000 upm und Raumtemperatur für 2 Minuten und anschließender Resuspension in einem Restvolumen von etwa 75 μ l. Die Platten wurden etwa 15 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend direkt weiterverarbeitet oder bei 4°C gelagert.

Neben der oben beschriebenen Elektroporationsmethode bei der Klonierung von Konstrukten wurde bei der Expression der luminalen Domäne von LIMP-2 als rekombinantes Protein auch die Transformation per Hitzeschock durchgeführt. Dazu wurden 100 ng des im Expressionvektor pET22b (Novagene / Merck KGaA, Darmstadt) enthaltenen luminalen hLIMP-2 Konstrukts (bezogen von Geneart, Regensburg) mit 50 μ l einer Bakteriensuspension chemisch-kompenter *E. coli* Zellen des Expressionsstammes BL21 (DE3) (zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. B. Spudy, Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Grötzinger; Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) in einem Eppendorfgefäß gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch eine 1 minütige Inkubation bei 42 °C im Thermomischer erfolgte der Hitzeschock, dem sich eine weitere Inkubation von 3 Minuten auf Eis anschloss, bevor der Ansatz mit 1 ml Antibiotika-freiem LB-Medium versetzt wurde und 1 Stunde bei 37°C und 600 upm im Thermomischer inkubierte. Das Ausplattieren der Bakteriensuspension auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platte erfolgte nach Zentrifugation bei 1500 g und 4°C für 2 Minuten und anschließender Resuspension mit einem Restvolumen von etwa 75 μ l. Die Platte wurde etwa 15 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag als Masterplatte zum Animpfen von *small-scale* Ansätzen genutzt.

3.2.1.9 Plasmidamplifikation und -reinigung

Mini-präparativ wurde Plasmid-DNA aus 3 ml 37°C Übernacht-Bakterienkulturen gewonnen. Dazu wurden von jeder Ligations-Platte (siehe Abschnitt 3.2.1.9) 4 Klone gepickt und je 3 ml entsprechendes Antibiotika-haltiges LB-Medium in sterilen Reagenzgläsern angeimpft und diese Bakterienkulturen dann etwa 18 Stunden bei 37°C im Drehrad inkubiert. Die Reinigung der Plasmid-DNA aus diesen Kulturen wurde mittels des *Miniprep Kits* der Firma Fermentas gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt und mit 50 µl dH₂O eluiert. Anschließend wurde die DNA nach Konzentrationsbestimmung und positivem Fragmentierungsmuster des Testverdaus sequenziert. Die Lagerung der Plasmide erfolgte kurzfristig bei 4°C und längerfristig bei -20°C.

Im 100 ml Maßstab wurde Plasmid-DNA Midi-präparativ nach Retransformation und der direkten Inokulation des entsprechenden Antibiotika-haltigen LB-Mediums mit dem 1 ml Transformationsansatz in 500 ml Schüttelkolben hergestellt. Die Reinigung erfolgte nach 18 stündiger Schüttelinkubation bei 37°C mit Hilfe des *Pure Yield Purification Midiprep Systems* der Firma Promega. Nach der Elution mit dH₂O, der Konzentrationsbestimmung und dem Testverdaus mit positivem Fragmentierungsmuster wurde die DNA sequenziert. Die Lagerung der so gereinigten Plasmid-DNA erfolgte ebenfalls bei 4°C bzw. -20°C.

3.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von DNA

Mit Hilfe des *Nanodrop* Spektrophotometers (Thermo Scientific) wurde beruhend auf der Absorptionsfähigkeit der DNA im UV-Wellenlängenbereich (Absorptionsmaximum bei $\lambda = 260$ nm) die in Mini- bzw. Midi-Präparation hergestellten Plasmid-DNA quantifiziert und ihre Qualität bewertet. Dazu wurden 1,5 µl der eluierten Plasmid-DNA auf den Probenhalter des Photometers pipettiert und gegen dH₂O als *Blank*-Referenz gemessen. Generell basiert die Quantifizierung der DNA auf dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$c = (A \cdot \epsilon) / b$$

mit c = Konzentration in ng/µg

A = Absorption in AU

ϵ = Wellenlängen-abhängiger Extinktionskoeffizient in ng - cm/µl

hier für doppelsträngige DNA = 50 ng - cm/µl

und b = Schichtdicke in cm

Die Konzentration wurde vom Gerät in ng/µl ausgegeben und lag für Mini- und Midi-Präparation bei etwa 500 bis 600 ng/µl.

Über die bloße Konzentrationsbestimmung hinaus lieferte diese photometrische Methode auch Aussagen über die Reinheit der DNA. Der Quotient von A_{260}/A_{280} zeigte die

Verunreinigung mit RNA (optimaler Wert ~1,8), der A_{260}/A_{230} Quotient (optimal im Bereich von 1,8 bis 2,2) die mit Proteinen und Kohlenhydraten an.

3.2.1.11 Sequenzierung

Sequenzierungen wurde von der Firma GATC Biotech AG, Konstanz durchgeführt. Dazu wurden je Konstrukt 2 µg DNA in einem Volumen von 30 µl (Konzentration [66 ng/µl]) an GATC verschickt. Diese Menge reichte für bis zu 8 Sequenzierungsreaktionen aus. Die entsprechenden Primer wurden ebenfalls als 30 µl Volumenaliquote mit einer Konzentration von 10 µM mit geschickt und ermöglichten ebenso 8 Sequenzierungsreaktionen. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte rechnergestützt mit der implementierten *Seqman*-Funktion des Programms *DNAStar*.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit lebenden Zelllinien wurden unter einer *Sterilbench* durchgeführt. Es wurden dabei sterile serologische Einwegpipetten (5, 10 und 25 ml) benutzt und nicht steril verpackte Materialien wurden vor ihrem Gebrauch unter der *Bench* entweder autoklaviert, gebacken oder mit 70%igem Ethanol bzw. mit Pursept-A desinfiziert. Vor ihrer Verwendungen wurden die entsprechenden Zellkulturmedien und das Trypsin/EDTA für die Passagierung der Zellen auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Die verwendeten adhärenenten Zelllinien, wie COS-7, Hela, HEK293, CHO und verschiedene MEF-Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen (Sarstedt) in DMEM *High Glucose with L-Glutamine* von PAA mit 10%igem Zusatz von nicht hitzeinaktiviertem FCS und 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin in einem Begasungsbrutschrank mit einer Wasserdampfatmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.2.2.2 Passagieren von adhärenenten Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens etwa zweimal wöchentlich. Dabei wurde zuerst das alte Zellkulturmedium abgesaugt und danach wurden die Zellen einmal mit sterilem autoklaviertem 1 x PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA Lösung wurde das Ablösen der adhärenenten Zellen initiiert und unterm Mikroskop verfolgt und überwacht. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wurde der Prozess durch die Zugabe von 9 ml frischen Kulturmediums abgestoppt und die Zellen durch behutsames Auf- und Abpipettieren zusätzlich vereinzelt. Anschließend erfolgte die Neuaussaat der Zellen in frischem Zellkulturmedium und 10 ml Zellkulturschale je nach Wachstumseigenschaften im Verhältnis 1:2 bis 1:50.

3.2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Unter der Kryokonservierung von Zellen versteht man das Einfrieren von Zellen zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff.

Dazu wurden entsprechende Zellen einer 10 cm Zellkulturschale bei 80%iger Konfluenz nach Verwerfen des Zellkulturmediums mit sterilem autoklaviertem 1 x PBS gewaschen und trypsiniert. Die abgelösten Zellen wurden dann in 9 ml Zellkulturmedium ohne Antibiotikazusatz aufgenommen und in ein 15 ml Sarstedtröhrchen überführt.

Bei 100 g und RT wurden die Zellen für 5 Minuten pelletiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 2 ml Zellkulturmedium ohne Antibiotikazusatz resuspendiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 ml eiskaltem Einfriermediums (DMEM-Zellkulturmedium mit

10% FCS, Pen/Strep und 20% sterilem DMSO) wurden vier 1 ml Aliquots in 1,5 ml Kryoröhrchen gegeben. Der Einfrierprozess fand dann zweistufig mit einer ersten Einfrierperiode über Nacht bei -80°C und der finalen Lagerung bei -196°C in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff statt.

3.2.2.4 Revitalisierung von Zellen

Die Revitalisierung kryokonservierter Zellen erfolgte gemäß dem folgenden Protokoll. Ein Kryoröhrchen mit Zellen wurde dem flüssigem Stickstoff-Tank entnommen und bei RT unter der *Sterilbench* kurz vorsichtig zum Druckausgleich geöffnet und danach wieder verschlossen. Nach dem nahezu vollständigem Auftauen der Zellsuspension, wurde diese in ein mit 5 ml frischem DMEM-Zellkulturmedium mit 10% FCS und Pen/Strep vorgelegtes Sarstedtröhrchen überführt. Das nach einem Zentrifugationsschritt, 5 Minuten bei 100 g und RT, erhaltene Zellpellet wurde mit 5 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen je nach Konfluenz entweder gewaschen und mit neuem Medium versetzt oder auf eine bzw. mehrere 10 cm Schalen umgesetzt.

3.2.2.5 Transiente Transfektion von Zellen

Die in der Zellkultur kultivierten eukaryotischen Zelllinien wurde mit der FuGeneHD Reagenz der Firma Roche gemäß Protokollvorgaben transient transfiziert. Bei dieser auf der Lipofektion basierenden Transfektionsmethode wird die Plasmid-DNA an kationischen Lipidvesikeln komplex gebunden und danach in die Zellen eingeschleust.

Je nach Fragestellung und Versuchsaufbau variierte die Aussaat- und Transfektionsbedingungen der Zellen.

Für die Untersuchung der Lokalisation von LIMP-2 Mutanten durch indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf sterilen Deckgläsern (4 *Coverslips* pro Loch einer 6-Loch Platte) 15 Stunden vor Transfektion in Zelltyp-abhängiger Verdünnung analog zum Passagieren ausgesät, zum Beispiel COS-7 Zellen 1 ml auf 2 ml Medium oder die LIMP-2 MEFs 0,5 ml auf 2,5 ml Medium. Die Transfektion der Zellen erfolgte dann bei 60 bis 80%iger Konfluenz. Während der Transfektionsansatz, bestehend aus 100 µl sterilem serumfreiem DMEM Medium ohne Antibiotika-Zusatz, 1 µg Plasmid-DNA und 3 µl FuGeneHD, bei RT für 30 Minuten inkubierte, wurden die Zellen mit sterilem 1 x PBS gewaschen und mit 2 ml frischem DMEM-Zellkulturmedium mit 10% FCS und Pen/Strep Zusatz versorgt. Die Analyse der Expression und Lokalisation der LIMP-2 Konstrukte erfolgte 12 bis 24 Stunden post Transfektion.

Für die Analyse mittels Immunoblotmethoden (*Western-Blot*) bzw. für PNGase bzw. EndoH Verdauversuche und Quervernetzungs-Experimente wurden die jeweiligen Zellen in 10 cm Zellkulturschalen und 6 ml Medium bei einer 80%igen Konfluenz mit einem 1 µg Plasmid-DNA Transfektionsansatz transfiziert. Die Zellernte fand bei 100%iger Konfluenz statt bzw. maximal 48 Stunden post Transfektion.

Die Transfektion für die Quervernetzungs-Experimente mit photoaktiven Aminosäuren erfolgte bei 80%iger Konfluenz in 6 cm Zellkulturschalen und 2 ml Medium analog zur Transfektion von Zellen in 10 cm Schalen.

Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz diente bei jeder Transfektion ein eGFP-Plasmid Ansatz. Die eGFP Expression wurde etwa 10 Stunden post Transfektion am Fluoreszenz-Mikroskop überprüft und protokolliert.

3.2.2.6 siRNA Knockdown von β -Glucocerebrosidase Hela-Zellen

Mit Hilfe der RNA-Interferenz Technik wurde die Expression von β -Glucocerebrosidase in Hela-Zellen herunter reguliert. Dazu wurden die Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und bis zu 90%iger Konfluenz kultiviert. Danach erfolgte die Transfektion der Zellen mit spezifischer anti- β -GC-siRNA (*small interfering RNA*) von Invitrogen unter Zuhilfenahme des INTERFERin Transfektionsreagenz (Polyplus transfection/Peqlab). Alle Arbeiten mit siRNA fanden unter der Sterilwerkbank mit gestopften Pipettenspitzen statt.

Die sich in ihrem GC-Gehalt unterscheidenden lyophilisierten anti- β -GC-siRNAs (GBAHSS142157 (high GC); GBAHSS142158 (med GC) und GBAHSS178140 (low GC)) sowie die Kontroll-siRNAs (ebenso niedriger, mittlerer und hoher GC Gehalt) wurden bei 4°C schonend aufgetaut und nach kurzem Zentrifugieren jeweils in 1000 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Dies ergab für jede der siRNAs eine 20 µM siRNA-Stocklösung in 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM NaCl; 1 mM EDTA. Es wurden dann 100 µl Aliquots in sterilen und RNase-freien Schraubdeckelgefäßen hergestellt und diese bis zu ihrem Gebrauch bei -20°C gelagert.

Um eine bessere Herunterregulierung der β -Glucocerebrosidase Expression zu gewährleisten, wurden alle drei spezifischen anti- β -GC-siRNAs in einem 500 µl Transfektionsansatz kombiniert.

Die Gesamt-Endkonzentration der siRNA im Zellkultur-Medium lag bei 20 nM, dies entsprach 6,7 nM je siRNA Typ, bei einem Gesamtvolumen von 6 ml. Vor dem Ansetzen des jeweiligen Transfektionsansatzes wurden 500 nM Vorverdünnung des 20 µM siRNA Stocks hergestellt, in dem 12,5 µl 20 µM siRNA mit 487,5 µl serumfreiem DMEM aufgenommen wurden. Ausgehend von dieser Vorverdünnung wurde dann gemäß der Tabelle 3.2-3 die

jeweiligen 500 µl Transfektionsansätze in sterile und RNase-freie Schraubdeckelgefäße pipettiert.

Tabelle 3.2-3: Pipettierschema siRNA Ansätze

Endkonzentration im Zellkulturmedium (Vol. 6 ml)	20 nM Kombi	20 nM Kontrollen	<i>Mock</i>
Volumen der 500 nM Vorverdünnung	Je 80,4 µl (= 40,2 pMol)	Je 80,4 µl (= 40,2 pMol)	0 µl
DMEM <i>only</i>	220 µl	220µl	461,2 µl
INTERFERin	40 µl	40 µl	40 µl

Nach kurzem Vortexen der Ansätze wurden diese für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und währenddessen die Zellen mit sterilem 1 xPBS gewaschen. Danach wurden 5,8 ml DMEM-Vollmedium je 10 cm Schale zu den Zellen gegeben, um anschließend erfolgte die Transfektion mit dem jeweiligen 500 µl Transfektionsansatz. Als weitere Kontrolle wurde eine Schale mit untransfizierten Zellen mitgeführt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 48 stündiger Inkubation/Kultivierung gemäß 3.2.2.7 und die Homogenisierung entsprechender der sich anschließenden Analyse, z.B PNGaseF oder EndoH Verdau.

3.2.2.7 Pelletierung von Zellen

Vor ihrer Ernte wurden die mit den zu erntenden Zellen bewachsenen 6 bzw. 10 cm Zellkulturschalen auf Eis heruntergekühlt. Es folgten nach dem Verwerfen des Medium-Überstandes drei Waschschrte mit eiskaltem semisterilen 1 x PBS. Danach wurden die Zellen mit 1 ml PBS/Complete unter Zuhilfenahme eines Zellkulturschaber geerntet und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Der Überstand wurde nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 upm und 4°C verworfen und das Zellpellet entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

3.2.2.8 Isolierung und Gewinnung von Lysaten aus Zellkulturzellen

Im Allgemeinen erfolgte die Gewinnung von Zelllysaten aus Zellhomogenaten die durch Aufnahme des Zellpellets mit Lysispuffer (1 x PBS/Complete 0,1% TritonX100) und zweimaligem Schallen im Ultraschallbad (Stufe 3, 90% Intervalldauer, 30 sec und 4°C) hergestellt wurden, dabei wurde das Volumen des Lysispuffer an die Größe des Pellets bzw. der Ausgangszellmenge angepasst und variierte von 50 bis 300 µl.

Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 14000 upm und 4°C wurde der Überstand (Zelllysate bzw. Proteinlysate) in ein neues Eppendorfgefäß zur weiteren Nutzung überführt.

Die Aufbereitung der Zellpellets für speziellere Analysen wie zum Beispiel dem Verdau mit PNGaseF oder EndoH ist an entsprechender Stelle beschrieben.

3.2.2.9 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen und deren mikroskopische Auswertung

12 bis 24 Stunden post Transfektion wurden die Zellen auf den *Coverslips* fixiert und mit den entsprechenden primären und sekundären Antikörpern gefärbt.

Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen semisteril mit 1 x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen in einer 20 minütigen Inkubation bei RT mit 2 ml 4%iger PFA / PBS Lösung je *well*. Dem schloss sich ein dreimaliger Waschschrift mit 1 x PBS an sowie die Permeabilisierung der Zellen durch eine fünfminütige Behandlung mit 2 ml 0,2% Saponin/PBS je *well*. Im nächsten Schritt wurden durch zehnmünütiges Einwirken des Blockierpuffers I (0,12% Glycin, 0,2% Saponin / PBS) (2 ml je *well*) die freien Aldehydgruppen des PFAs blockiert.

Nach einem Waschschrift mit 0,2% Saponin / PBS folgte der zweite Blockschrift mit 2 ml Blockierpuffer II (3% BSA in 0,2% Saponin / PBS) je *well* mit einer Inkubationsdauer von 60 Minuten bei RT, um spätere unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Während dessen wurden die primären Antikörperlösungen (verwendete Primärantikörper und ihre Verdünnungen siehe 3.1.11) je Fragestellung im Blockierpuffer II angesetzt und als 50 µl *Spots* auf Parafilmstreifen in einer „feuchten Kammer“ vorbereitet.

Die *Coverslips* wurden aus der 6-well Platte entnommen und mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf die Primärantikörper-Tropfen gelegt und für 75 bis 90 Minuten bei RT in der „feuchten Kammer“ inkubiert. Zum Ende der Inkubationszeit hin wurden die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen siehe 3.1.11) im Blockierpuffer II angesetzt und als 50 µl Aliquots auf Parafilmstreifen in der „feuchten Kammer“ *gespottet*.

Material und Methoden

Vor der ebenfalls 75 bis 90 Minuten dauerenden Inkubation (dunkel in der „feuchten Kammer“ bei RT) mit den Sekundärantikörpern wurden die *Coverslips* viermal in 0,2%iger Saponin / PBS Lösung gewaschen und anschließend auf die Antikörper-*Spots* gelegt.

Nach fünfmaligen Waschen in 0,2%iger Saponin / PBS Lösung und zweimaligen Waschen in dH₂O wurden die *Coverslips* kurz auf Zellstoffpapier abgetropft und anschließend mit dem Einbettungsmedium auf Objektträgern eingebettet. Nach der Durchhärtung wurden die *Coverslips* bei RT im Dunkeln gelagert.

Die erste Auswertung erfolgte mit dem Axiovert 200M Mikroskop und der *Axio Vision 4.1 Software* der Firma Zeiss, eine detailliertere dann mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) FluoView FV1000 und der FV10-ASW 2.0 bzw. 3.0 *Software* der Firma Olympus.

Folgende Einstellungen wurden beim LSM genutzt:

Objektiv: UPLSAPO 100x O NA: 1.40

Aufnahme-Modus:

Oneway 12,5 µs/Pixel *AutoHV*

Größe: 1:1

Zoom: 2.0

Laserwellenlängen und ihre Intensität:

405 nm – 5,0% 488 nm – 4,0% 559 nm – 10,0%

Kanäle:

Dapi (405 nm Laser); AlexaFluor488 (488 nm Laser); AlexaFluor594 (559 nm Laser)

Gain: 2 *Offset*: 7 *HV*: ~400

Filter Modus:

Kalman *Line 3x* Analog Int. Sequentiell *Line*

Je Kanal eine Gruppe

Gain, *Offset* und *HV* wurden kanalspezifisch je Intensität der Färbung individuell ausgehend von obigen Startwerten angepasst.

Eine erste Bearbeitung der aufgenommen Bilder erfolgte mit der gerätespezifischen *Software* und nach dem Export in ein TIF-Format (24Bit) wurden die Bilder mit Adobe Photoshop CS4 entsprechend weiterbearbeitet.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Rekonstitution von Proteinen.

Die Rekonstitution der von JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin synthetisierten hLIMP-2 Peptide erfolgte wie folgt:

Eine Spatelspitze Peptid (hLIMP-2_L152-V173) wurde in ein steriles Schraubdeckelgefäß überführt, dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig des lyophilisierten Materials aufgrund der elektrostatischen Aufladung verloren ging. Das lyophilisierte Peptid wurde dann je nach Menge durch Zugabe von 10 bis 70 µl 0,1%iger HCl gelöst mit dem entsprechenden 9fachen Volumen (90 – 630 µl) an 0,2 µm gefiltertem 50 mM NaAcetat-Puffer ohne Salz pH 5 umgepuffert. Andere Pufferbedingungen waren für dieses Peptid nicht praktikabel, da das Peptid dann präzipitierte. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 28000g und 4°C wurde der Überstand in ein neues steriles Schraubdeckelgefäß überführt und die Konzentration per *Nanodrop* Spektrometer (vgl. 3.2.3.2) bestimmt. Je nach sich anschließender Analysemethode wurde die Peptidlösung entsprechend mit 0,2 µm gefiltertem 50 mM NaAcetat-Puffer ohne Salz pH 5 auf die benötigte Konzentration eingestellt und diese nochmals am *Nanodrop* Spektrometer kontrolliert, dies diente auch der Überprüfung einer möglichen Präzipitation des Peptides.

Das zweite Peptid, welches um zwei Aminosäuren länger war und zusätzlich über ein Biotin-*Tag* und einem Ttds-Linker an der N-terminalen Aminosäure verfügte, Biotin-Ttds-hLIMP-2_L152-E175, wurde analog zum ersten Peptid rekonstituiert, jedoch mit dem Unterschied, dass hier 0,2 µm gefilterter 50 mM NaPhosphat-Puffer mit 150 mM NaCl pH 7 zum Umpuffern und Einstellen verwendet wurde.

Für die Rekonstitution der rekombinanten β -Glucocerebrosidase wurde eine Spatelspitze kristallines Protein aus übriggebliebenen Cerezyme®400U Patientendosen (Imiglucerase, Handelsname Cerezyme®400U; Genzyme GmbH, Neu-Isenburg) entnommen und in einem sterilen Schraubdeckelröhrchen mit 500 µl 0,2 µm gefiltertem dH₂O gelöst. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 28000g und 4°C wurde der Überstand in neues Schraubdeckelgefäß gegeben und die Proteinkonzentration mit dem *Nanodrop* gemessen. Diese sollte mehr als 0,6 mg/ml betragen. Anschließend erfolgte die Umpufferung über eine NaP-5 Säule (GE Healthcare) in jeweiligen Puffer, z.B. 50 mM NaPhosphat-Puffer mit 150 mM NaCl pH 7. Dazu wurde die Säule zuerst mit 10 ml Elutionspuffer, hier 50 mM NaPhosphat-Puffer 150 mM NaCl pH 7, equilibriert. Danach wurden 500 µl der in Wasser gelösten β -Glucocerebrosidase auf die Säule geladen und abschließend mit 1 ml 50 mM NaPhosphat-Puffer 150 mM NaCl pH 7 in ein steriles Schraubdeckelgefäß eluiert. Nachdem

die Säule mit 10 ml 20% EtOH gespült worden war, wurde sie mit 20% EtOH bei Raumtemperatur gelagert. Das Eluat wurde 10 Minuten bei 28000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand in ein frisches Schraubdeckelgefäß überführt und am *Nanodrop* die Konzentration gemessen. Nach Einstellen des Eluates auf 0,15 mg/ml mit 50 mM NaPhosphat Puffer 150 mM NaCl pH 7 erfolgte wenn nötig die Lagerung bei 4°C. Die Kontrollproteine BSA und Ovalbumin für die Peptid-Bindestudien wurden direkt in jeweils 1 ml 50 mM NaPhosphat-Puffer 150 mM NaCl pH 7 gelöst und der Überstand nach Zentrifugieren weiterverwendet. Andere Proteine wie zum Beispiel die Standardproteine für die Kalibrierung bei der Größenausschlusschromatographie wurden in den jeweiligen Referenzpuffern gelöst.

3.2.3.2 Proteinbestimmung mittels BCA und UV₂₈₀ Messung

Standardmäßig wurde der Proteingehalt in den Zelllysaten mit dem *BCATM Protein Assay Kit* der Firma Pierce/Thermo Fisher bestimmt. Dieser Test beruht auf der Biuret-Reaktion, der Komplexbildung von Proteinen mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung und der anschließenden violetten Farbkomplexbildung von Bicinchoninsäure (BCA) mit zu Cu⁺ reduzierten Cu²⁺-Ionen, die bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm photometrisch gemessen werden kann. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde 5 µl vom Lysat abgenommen und mit dH₂O 1:5 verdünnt. Da der Test in Doppelwertbestimmung durchgeführt wurde, wurden zweimal 10 µl der Verdünnung abgenommen und jeweils in ein Loch einer 96-Loch-Platte (Sarstedt) pipettiert. Als Standard wurde eine 8 stufige Verdünnungsreihe (2 mg/ml bis 0,025 mg/ml) des Standardproteins BSA ebenso in Doppelansätzen mitgeführt.

Zu jedem Ansatz wurden dann je 200 µl BCA-Lösung (Reagenz A und B im Verhältnis 1:50) hinzupipettiert.

Die Extinktion der gefärbten Proteinlösung wurde mit Hilfe des Synergy HT Mikrotiterplatten-Photometers der Firma BioTek bei 562 nm gemessen und der Proteingehalt in der Ausgangsprobe mit dem Microsoft Programm Excel berechnet.

Für die Quantifizierung der LIMP-2 *coiled-coil* Peptide und der rekombinanten β -Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Handelsname Cerezyme[®] 400U; Genzyme GmbH, Neu-Isenburg), bei der das Signalpeptid von Aminosäure 1 bis 39 fehlt, wurde auf die direkte spektrophotometrische Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm mit dem *Nanodrop* Spektrometer (s.o.) zurück gegriffen. Die spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe des Online-Tools Expasy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) basierend auf der Edelhoch Methode (Edelhoch, 1967) über folgende Formel berechnet, wobei die Extinktionskoeffizienten für Tryptophan und Tyrosin von Pace *et al.* (Pace et al., 1995) Verwendung fanden:

$$\epsilon_m = (n_{\text{Trp}} \cdot 5500) + (n_{\text{Tyr}} \cdot 1490) + (n_{\text{Cys}} \cdot 125), \text{ in [l/(mol} \cdot \text{cm)]}$$

n = Anzahl der jeweiligen Aminosäure innerhalb der Proteinsequenz.

Für die Peptide hLIMP-2_L152-V173 und Biotin-Ttds-hLIMP-2_L152-E175 ergab sich:

$$\epsilon_m = 1490 \text{ [l/(mol} \cdot \text{cm)]}$$

Für β -Glucocerebrosidase ergab sich: $\epsilon_m = 94500 \text{ [l/(mol} \cdot \text{cm)]}$ als gemittelter Koeffizient.

Aus dem molaren Extinktionskoeffizienten folgt der prozentuale Extinktionskoeffizienten [ml/mg \cdot cm] über:

$$\epsilon_{\%} = \epsilon_m / \text{MW mit MW = Molekulargewicht in [Da]}$$

und somit mit den folgenden Molekulargewichten:

hLIMP-2_L152-V173	= 2673,22 Da	$\epsilon_{\%} = 0,557$
Biotin-Ttds-hLIMP-2_L152-E175	= 2876,35 Da (Peptidanteil)	$\epsilon_{\%} = 0,518$
Humane β -Glucocerebrosidase	= 55654,5 Da (reiner Proteinanteil)	$\epsilon_{\%} = 1,698$

Mit dem prozentuale Extinktionskoeffizienten ergibt sich unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetz aus der gemessen Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ die Konzentration der Proteinlösung c [mg/ml] bei einer Schichtdicke von 1 cm wie folgt:

$$c_{\text{mg/ml}} = A / (d \cdot \epsilon_{\%}) \text{ mit } A = \text{Absorption in AU und } d = \text{Schichtdicke in cm}$$

hLIMP-2_L152-V173	1 AU = 1,8 mg/ml
Biotin-Ttds-hLIMP-2_L152-E175	1 AU = 1,9 mg/ml
Humane β -Glucocerebrosidase	1 AU = 0,6 mg/ml

Als Standardeinstellung ist im Spektrometer selbst folgende Relation hinterlegt:

$$1 \text{ AU} = 1 \text{ mg/ml.}$$

3.2.3.3 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Um den Erfolg der Rekonstitution der synthetisierten LIMP-2 Peptide zu verfolgen, sowie Aussagen über ihre Sekundärstruktur treffen zu können, wurde auf die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie zurückgegriffen. Bei dieser Methode der Konformationsanalyse wird der Absorptionsunterschied zwischen rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht an den Peptidbindungen ($n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge) des Proteinrückgrats ausgenutzt. Dazu wird die Differenz des Absorptionsunterschiedes ($\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$), der sogenannte Cotton-Effekt angegeben als Elliptizität (Θ), gegen die Wellenlänge des verwendeten Lichtes aufgetragen. Wird nun nicht nur Licht einer Wellenlänge verwendet, sondern ein Spektrum aufgenommen, ergibt sich ein CD-Spektrum. Dieses umfasst üblicherweise den Bereich von $\lambda = 190 - 250 \text{ nm}$. Der Cotton Effekt selbst kann wellenlängenabhängig positiv als auch negativ sein. So weisen Spektren von α -helikalen Peptiden einen negativen Cotton-Effekt bei $\lambda = 207 \text{ nm}$ und 222 nm auf und einen positiven bei $\lambda = 192 \text{ nm}$. Dagegen zeigen Spektren von antiparallelen

β -Faltblattstrukturen ein Minimum bei $\lambda = 215$ nm bis 220 nm und ein Maximum bei $\lambda = 195$ nm (vgl. Abbildung 3.2-1)

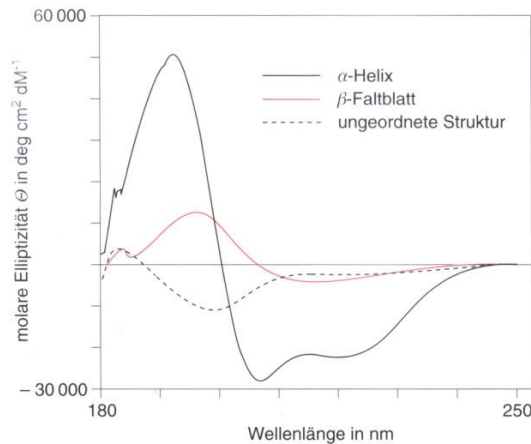


Abbildung 3.2-1: CD-Spektren von Peptiden mit verschiedenen Konformationen.

Quelle: Lottspeich & Engels, Bioanalytik 2.Auflage 2006 S.528 unten.

Die gemessene Elliptizität Θ_λ kann gemäß folgender Gleichung normiert werden:

$$\Theta_\lambda^{\text{MRW}} = (\Theta_\lambda \cdot \text{MRW}) / (d \cdot c) \text{ in } [\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}]$$

mit: Θ_λ = gemessene Elliptizität [deg]

MRW = mittlere Molekülmasse aller im gemessenen Peptid vorkommenden Aminosäurereste in [g/dmol]

hLIMP-2_L152-V173 = 12,151 g/dmol

Biotin-Ttds-hLIMP-2_L152-E175 = 11,985 g/dmol

d = Schichtdicke der Küvette [cm]; c = Konzentration der Probe [g/ml]

Für die CD-Messung wurden die LIMP-2 Peptide gemäß 3.2.3.1 rekonstituiert und auf eine Konzentration von etwa 0,75 bis 0,9 mg/ml eingestellt. Eine Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 0,01 mm (Helma Analytics GmbH & Co. KG) wurde mit knapp 50 μ l dieser Peptidlösung luftblasenfrei beladen und im Jasco J-720 CD Spektropolarimeter (Jasco Corp.), kalibriert nach Chen und Yang (Chen and Yang, 1977), in Dreifachbestimmung vermessen. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur, einer spektralen Bandbreite von 2 nm und in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 250 nm aufgenommen. Als Kontrolle wurde der zur Rekonstitution verwendete Puffer ebenfalls vermessen und als Basislinie mit dem Probenspektrum mittels der Datenaufnahme- und Analysesoftware Spectra Manger (Jasco Corp.) verrechnet und ins Ascii Format exportiert. Anschließend wurde das Rohspektrum wie oben angegeben in Excel normiert.

3.2.3.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) -Spektroskopie

Mit Hilfe der NMR (*nuclear magnetic resonance*) Spektroskopie und hier insbesondere der zweidimensionalen homonukleare Variante (Messung der Wasserstoffprotonen), wurde die Tertiärstruktur des LIMP-2 Peptides hLIMP-2_L152-V173 in Lösung untersucht und nach Auswertung der aufgenommenen NOESY (*Nuclear Overhauser effect spectroscopy*)-Spektren bestimmt.

Für die Messung wurden zwei Spatelspitzen des Peptides in 70 µl 0,1% HCl gelöst und anschließend durch Zugabe von 630 µl 50mM NaAcetat-Puffer / 7% D₂O pH5 umgepuffert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 31000g und 4°C wurde der Überstand weiterverwendet. Die Konzentrationsbestimmung am *Nanodrop* Spektrometer ergab einen Proteingehalt von $c_{\text{Peptid}} = 0,468 \text{ mg/ml}$, dies entsprach gemäß:

$$c_{\text{Peptid}} / M_{\text{Peptid}} = 0,468 \text{ g/l} / 2673 \text{ g/mol} = 0,000175 \text{ mol/l}$$

einer 0,175 mMol Lösung.

300 µl der Lösung wurden in ein Shigemi-NMR-Probenröhrchen überführt und Herrn Professor Dr. Frank Sönnichsen (Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Messung überlassen. Diese wurde an einem Bruker Avance 600 MHz Spektrometer (Bruker Corp., MA, USA) ausgestattet mit einer aktiv abgeschirmten *Z-gradient triple resonance cryoprobe* vorgenommen.

Die Auswertung der durch die NMR-Messung generierten Daten und NOESY-Spektren verschiedener Mischzeiten wurde von Herrn Dr. Sascha Jung (Arbeitsgruppe Prof. Dr. J.Grötzinger; Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) mit Hilfe der im NMRPipe Softwarepaket (Delaglio, Grzesiek, Vuister et al., 1995) implementierten Prozessierungs- und Auswerteprogramme NMRDraw und NMRView (Johnson, 2004) durchgeführt. Dabei diente das interne Wassersignal der Probe als Referenz für die chemischen Verschiebungen der Protonen.

Mit dem Programm CYANA (Güntert, 2004) wurde auf Basis der vorgegebenen Abstände 100 Strukturberechnungen durchgeführt. Aus diesen wiederum wurden die 10 mit der niedrigsten Zielfunktion als Ensemble ausgewählt. Im Programm WHAT IF (Vriend, 1990) wurde dann aus diesem Ensemble eine mittlere Struktur errechnet. Die anschließende Energieminimierung erfolgte mit dem Programm GROMOS (van Gunsteren et al., 1996) und abschließende graphische Darstellung der Struktur erfolgte per MOLMOL-2K.2 (Koradi et al., 1996).

3.2.3.5 Präzipitation rekombinanter β -Glucocerebrosidase

Die *coiled coil* Domäne des humanen LIMP-2 Proteins wurde als synthetisiertes Peptid über ein Biotin Tag an eine Streptavidin Matrix gebunden, anschließend wurde geprüft, ob diese Domäne allein ausreicht rekombinante β -Glucocerebrosidase zu binden. β -Glucocerebrosidase wurde gemäß 3.2.3.1 in 50 mM NaPhosphat-Puffer mit 150 mM NaCl pH 7 rekonstituiert. Die Endkonzentration bei allen Experimenten wurde mittels Messung der Absorption bei 280 nm mit dem *Nanodrop* Spektrometer auf 0,15 mg/ml eingestellt.

Dies entspricht bei einem Probenvolumen von 500 μ l und einem Molekulargewicht von 55654,5 g/mol 1,34 nmol. Das über einen Ttds-Linker am N-Terminus Biotin markierte LIMP-2_L152-E175 Peptid wurde wie unter 3.2.3.1 beschrieben ebenso in 50 mM NaPhosphat-Puffer mit 150 mM NaCl pH 7 rekonstituiert.

Für die Bindestudien wurde das Peptid in etwa dreifach molarem Überschuss eingesetzt (Molekulargewicht: 3404,04 g/mol inkl. Biotin). Das zu verwendende Volumen variierte dabei je nach Konzentration der Peptidlösung. Es kamen zudem sechsfach und neunfach molare Mengen an Peptid zum Einsatz. Die zur Kontrolle verwendeten Proteine BSA und Ovalbumin wurden nach Lösen in 50 mM NaPhosphat-Puffer mit 150 mM NaCl pH 7 in etwa doppelt molarer Menge wie β -Glucocerebrosidase eingesetzt.

Als Kontrollen liefen parallel zum eigentlichen Probenansatz, der sowohl das Peptid als auch das jeweilige zu bindende Protein enthielt, Ansätze mit dem Peptid allein, dem zu bindenden Protein allein sowie einem Ansatz nur mit den verwendeten Puffern (der Peptidpuffer enthielt durch das initiale Lösen mit 0,1% HCl noch 0,01% HCl) mit.

Die Ansätze wurden jeweils in sterile Schraubdeckelgefäße pipettiert und für etwa 14 bis 16 Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Zum Ende der Inkubationszeit, wurden die Streptavidin *high capacity beads* (Thermo Scientific/Pierce ArtNr.20359) vorbereitet und equilibriert. Dazu wurden $(n_{\text{Ansatz}} + 1) \cdot 50 \mu\text{l}$ der 50% *Beadsuspension* aus der Vorratsbehältnis entnommen und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Nach einem einminütigen 4000 upm Zentrifugationsschritt bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das selbige Volumen an 50 mM NaPhosphat-Puffer mit 150 mM NaCl pH 7 wurde zu den *Beads* gegeben und es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 4000 upm für 1 Minute bei 4°C, nach dem erneut der Überstand abgenommen und verworfen wurde. Dieses wurde noch zweimal wiederholt. Abschließend wurde nochmals selbiges Volumen an Puffer zu den *Beads* gegeben und die nun equilibrierte 50%ige Suspension wurde in Aliquots zu 50 μ l in sterile Schraubdeckelgefäße aufgeteilt. Diese wurde nochmals bei 4000 upm und

4°C für 1 Minute zentrifugiert, so dass nach Verwerfen des Überstand 25 µl Streptavidin-Sepharose-Aliquots übrig blieben.

Von den inkubierten Ansätzen wurde jeweils eine 72,5 µl Probe („*Auftrag*“) gezogen und für die sich anschließende Analytik bei 4°C gelagert. Vom restlichen Volumen wurde je 425 µl zu den *Beads* gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Drehrad und einem einminütigem Zentrifugationsschritt mit 4000 upm bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und bis zur sich anschließenden Analytik bei 4°C gelagert („*Ungebunden*“)

Danach folgte ein sich dreimal wiederholender Waschschrift der *Beads* mit 50 mM NaPhosphat-Puffer mit 150 mM NaCl pH 7. Zuerst wurde selbiges Volumen an Puffer wie der zuvor abgenommene Überstand zu den *Beads* gegeben. Danach wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur drehend inkubiert und nach Zentrifugation, 1 Minute mit 3200 upm bei 4°C, der Überstand abgenommen und aufgehoben („*Wasch 1 bis 3*“). Nach dem ersten Waschschrift konnte das Volumen des Waschpuffers gegebenenfalls auf 1 ml erhöht werden. Optional wurden vor dem dritten Zentrifugieren je zweimal 50 µl der *Beadsuspension* abgenommen und für einen β -Glucocerebrosidase Enzymassay verwendet. Das finale *Beadpellet* wurde mit 60 µl reduzierendem 1 x Lämmli-Puffer versetzt und für 20 Minuten bei 60°C erhitzt. Nach Zentrifugieren für 2 Minuten mit 13000 upm bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und bei 4° gelagert („*Gebunden*“). Die sich anschließende Analytik setzte sich aus folgenden Methoden zusammen, Proteingehaltsbestimmung UV_{280nm} per *Nanodrop* (3.2.3.2), β -Glucocerebrosidase Enzymassay (3.2.3.16) sowie SDS-PAGE mit Coomassie Färbung (3.2.3.15) und optionalem *Western-Blot* (3.2.3.14).

3.2.3.6 Rekombinante Expression von Proteinen in HEK293-6E Zellen

Die rekombinante Expression der luminalen Domäne von LIMP-2 fand in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Konrad Büssow (AG Strukturuntersuchungen an Faktoren der Pathogenabwehr) am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, statt. Zur Vorbereitung der Expression der luminalen Domäne von LIMP-2 wurde die entsprechende DNA Sequenz des humanen LIMP-2 Proteins (hLIMP-2_A32-E420) in den zur Verfügung gestellten Expressionsvektor pEFS_sighis kloniert. Dieser Vektor enthielt ein Sekretionssignal sowie ein HIS-Tag, welche flankierend zur hLIMP-2_A32-E420 Sequenz lagen.

Folgendes Fließschema stellt die wesentlichen Schritte des Ablaufes der Analytik beginnend mit der rekombinanten Expression dar.

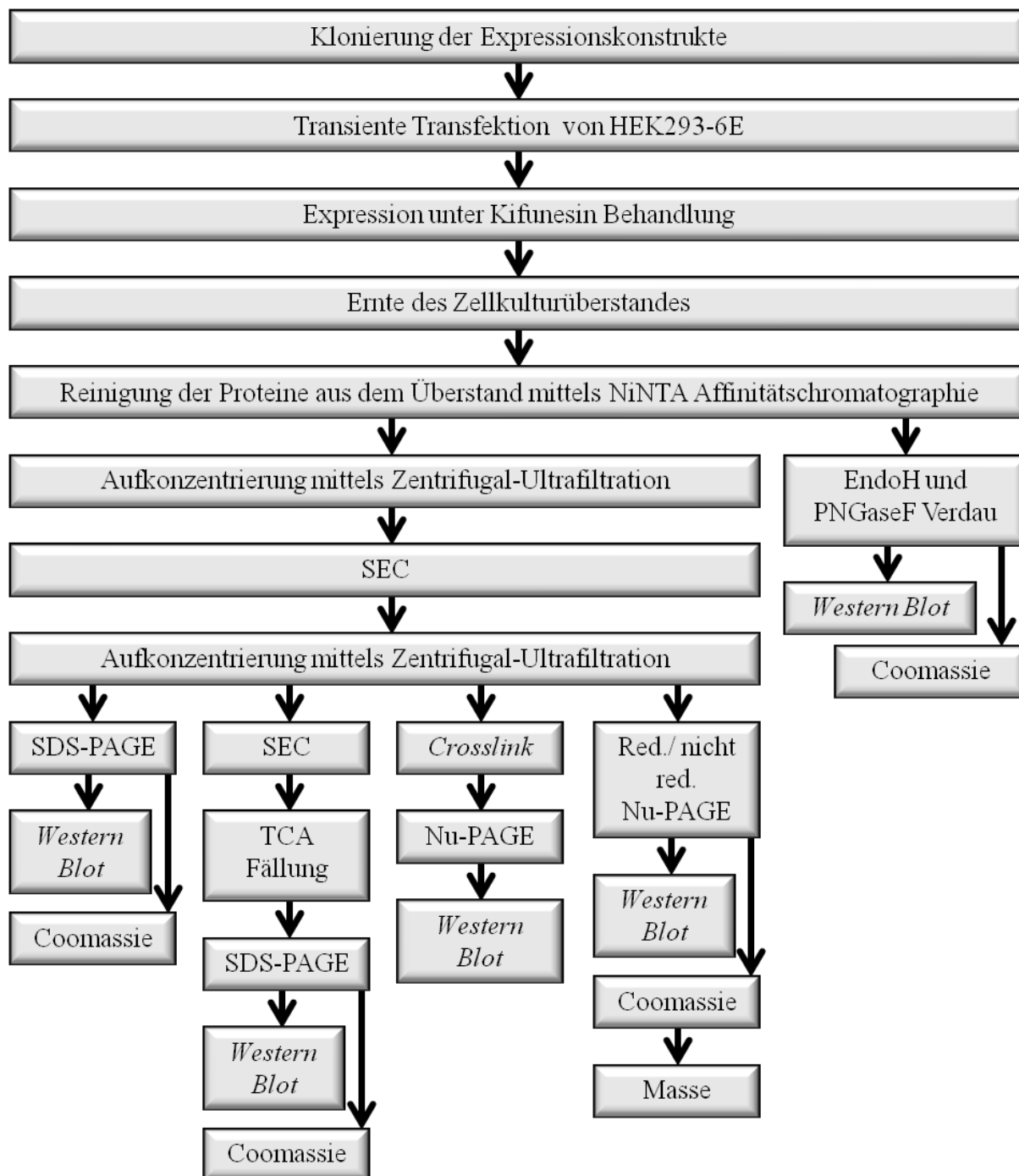


Abbildung 3.2-2: Fließschema der wesentlichen Schritte bei der Analytik der in den HEK-Zellen hergestellten Proteine.

HEK293-6E (*Human Embryonic Kidney*) Suspensionszellen wurden in F17 Expressionsmedium mit 7,5 mM Glutamin, 0,1% Pluronic Antischaum und 25 mg/l G418 Antibiotikum in *Spinner-Flasks* bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert. Für die transiente Transfektion wurden 200 bis 400 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1,2 bis 1,75 x 10⁶ Zellen pro ml verwendet und diese mit dem Mannosidase I Inhibitor Kifunensin

(final 0,005 mM) versetzt. Durch Kifunensin (Elbein et al., 1990) wurde eine einheitliche EndoH sensitive mannosereiche Glykosylierung der sekretierten Glykoproteine erreicht.

Die Transfektion der Konstrukte, 1 µg Gesamt-DNA pro 1 ml Zellsuspension, erfolgte unter sterilen Bedingungen mittels linearem PEI (Polyethylenimin) (Tom, Bisson and Durocher, 2008). Dazu wurden zuerst die DNA-Konstrukte und das PEI aufgetaut, sowie 0,1 ml Medium je ml zu transfizierender Zellsuspension auf 37°C vortemperiert. Danach wurde die entsprechende Menge DNA in einem 15 bzw. 50 ml PS-(Polystyrol)-Röhrchen in die Hälfte des vortemperierten Mediums pipettiert, die Gesamt-DNA Menge setzte sich dabei aus 95% zu exprimierendes Konstrukt und 5% GFP-Kontrollplasmid zusammen. Parallel dazu wurde in einem zweiten 15 bzw. 50 ml PS-(Polystyrol)-Röhrchen zur anderen Hälfte des Mediums die 2,5 fache Menge an PEI (Stock 1 mg/ml) gegenüber der DNA-Menge hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen wurde die PEI/Mediums Lösung zum DNA Ansatz hinzugegeben und die Mischung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNA PEI Mix wurde dann zur Zellsuspension gegeben und diese sofort gut geschwenkt. 48 Stunden post Transfektion wurde die Zellsuspension mit demselben Volumen (inkl. 0,005 mM Kifunensin) an frischem Medium expandiert. Nach Zugabe von TN1 (final 0,5%) wurden die Zellen gesplittet und danach in zwei Kolben weiter kultiviert. Für das *Monitoring* der Expression wurde 48 und 72 Stunden sowie 144 Stunden post Transfektion am Ende der Expression eine 500 µl Probe gezogen, die per FACS Analyse (Guava System, Millipore) auf Transfektionseffizienz und Lebendzellzahl hin untersucht wurde. 72 Stunden post Transfektion wurden den Expressionsansätzen Glukose (final 4,5 g/l) zugefügt. 96 Stunden post Transfektion erfolgte dann die Zugabe von Valproinsäure (final 3,75 mmol/l). Nach 144 Stunden Expression wurde der Überstand durch 60 minütige Zentrifugation bei 1000g von den pelletierten Zellen getrennt und anschließend 0,2 µm steril filtriert. Das Zellpellet wurde optional bei -20°C gelagert. Das sekretierte Protein wurde über den HIS-Tag mittels Affinitätschromatographie aus dem Überstand gereinigt.

3.2.3.7 Affinitätschromatographie

Um die in den HEK293-6E Suspensionszellen exprimierten Proteine aus dem Zellkulturüberstand isolieren zu können, wurden diese als Fusionproteine mit einem Polyhistidinschwanz (HIS-Tag) exprimiert. Die Reinigung erfolgte dann aus dem 0,2 µm gefilterten Überstand per Affinitätschromatographie, genauer per IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (siehe oben). Dazu wurde eine mit 20 ml NiNTA Superflow (Qiagen) gepackte XK50/20 Säule (Äkta FPLC System GE Healthcare) verwendet, die mit 5 Säulenvolumen (5 mal 20 ml = 100 ml)

300 mM NaCl in 50 mM NaPhosphat Puffer pH 7,6 equilibriert wurde. Alle eingesetzten Puffer wurden zuvor entgast und 0,2 µm steril filtriert. Es wurde bei 4°C gearbeitet und die Flussgeschwindigkeit betrug bei allen Schritten 10 ml/min. Dabei wurde der Verlauf der Chromatographie über die Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Nach dem der gesamte Überstand von 400 bis 900 ml Volumen auf die Säule geladen war, wurde diese mit 20 Säulenvolumen (= 400 ml) Waschpuffer (20 mM Imidazol und 300 mM NaCl in 50 mM NaPhosphat Puffer pH 7,6) gewaschen. Anschließend erfolgte die Stoßelution mit dem Elutionspuffer (Waschpuffer mit 400 mM Imidazol statt 20 mM). Es wurden 10 ml Fraktionen gesammelt und die mit einem höheren Absorptionverhalten als der eingesetzte Elutionspuffer wurden weiterverwendet. Die entsprechenden Fraktionen wurden bei 4°C nach Kiel ins Biochemische Institut überführt. Nachdem mit Proben der am stärksten absorbierenden Fraktionen eine erste Analytik durchgeführt wurde, wurden alle Protein enthaltenen Fraktionen vereinigt. Über Ultrafiltration mittels Vivaspin20 Zentrifugalkonzentratoren mit einem Größenausschluss von 30 kDa (Sartorius AG) wurde der Fraktionenpool auf eine Endvolumen von etwa 12 ml eingengt. Hierfür wurde bei 4500g in einer auf 4°C abgekühlten Untertischzentrifuge zentrifugiert. Das Permeat wurde verworfen und das Retentat mittels Größenausschlusschromatographie weiter analysiert.

3.2.3.8 Größenausschlusschromatographie

Bei der Gelfiltration bzw. Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography* = SEC) wurden die Proteine bzw. Proteinkomplexe in einer Probe nach ihrer Größe aufgetrennt und in entsprechenden Fraktionen gesammelt. Große Proteinkomplexe eluieren dabei zuerst von der Säule wohingegen kleinere Proteine aufgrund ihrer Permeation in das Säulen-Trägermaterial mit größeren Retentionsvolumina eluieren.

Die eingesetzten Laufpuffer wurden 0,2 µm steril filtriert und anschließend gründlich entgast. Vor ihrem Auftrag wurden die Proben für 15 Minuten bei 30000g zentrifugiert um eventuelle Partikel-Verunreinigungen abzutrennen.

Die SEC-Versuche wurden mit den FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) Systemen Äkta Explorer und Purifier (GE Healthcare) durchgeführt.

Die Reinigung des eingengten NiNTA-Isolats fand dabei im präparativen Maßstab mit Hilfe einer Superdex200 Hiload 16/60 Säule statt. Dazu wurde das Gesamtvolumen von 12 ml in einen sogenannten *Superloop* geladen, aus dem dann die Injektion mit je 4 ml in drei aufeinander-folgenden Läufen erfolgte. Als Lauf-/Elutionspuffer wurde 150mM NaCl in 50mM NaPhosphat Puffer pH 7 verwendet. Der Verlauf der Gelfiltration wurde anhand der UV_{280nm} Messung verfolgt. Das Eluat wurde in Elutionsfraktionen mit jeweils 1 ml Volumen

gesammelt. Fraktionen der sich ergebende gleichen Teilpeaks der drei Läufe wurden entsprechend vereinigt und über Ultrafiltration mittels Vivaspin20 Zentrifugalkonzentratoren mit einem Größenausschluss von 30kDa (Sartorius AG) konzentriert, dabei wurde das Permeat verworfen und das Retentat weiterverwendet.

Für die analytischen Untersuchungen einzelner NiNTA- oder konzentrierter SEC-Fractionen wurden 500 µl bis 2 ml Probe auf die Säule geladen und analysiert. Für die Kalibrierung der Säule wurden neben den Kalibrierungsproteinen (Ferritin; Catalase; Aldolase; Ovalbumin und BSA) des Herstellers auch rekonstituierte rekombinante β -Glucocerebrosidase eingesetzt.

Die Analytik der synthetisierten hLIMP-2 Peptide lief über eine SuperdexPeptide 10/300 GL Säule, wobei das Probenvolumen 100 µl betrug und als Laufpuffer 150 mM NaCl in 50 mM NaPhosphat Puffer pH 7 bzw. 50 mM NaAcetat Puffer ohne Salz pH 4,7. Kalibriert wurde die Säule gemäß Herstellerangaben mittels RibonucleaseA, Aprotinin, Glycin und Vitamin B12.

3.2.3.9 Massenspektroskopische Untersuchungen

Die Untersuchung der über Ni-NTA angereicherten und per Größenausschlusschromatographie (3.2.3.8) fraktionierten HEK293-6E Zellkultur-Überstände erfolgte, nach ihrer Auftrennung per reduzierender SDS-PAGE (3.2.3.14.1) und Coomassie-Anfärbung mittels *PageBlue* (3.2.3.15), mit Hilfe der LC-ESI-MS² Analyse. Diese wurde freundlicherweise durch Herrn Dr. Bart H.J. van den Berg aus Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Andreas Tholey am Institut für Experimentelle Medizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

3.2.3.10 Deglykosylierung von Proteinen

3.2.3.10.1 Allgemeine Beschreibung

Um Glykoproteine wie zum Beispiel LIMP-2 zu deglykosylieren und zur Unterscheidung zwischen prä- oder post Golgi Lokalisation dieser Proteine bzw. LIMP-2 Varianten, wurden diese mit den Endoglykosidasen PNGaseF und EndoH behandelt. Diese beiden Enzyme spalten selektiv die am Stickstoff der freien Säureamidgruppe von Asparagin N-glykosidisch gebundenen Zuckerstrukturen ab (siehe Abbildung 3.2-3). Dabei gibt es aber Unterschiede bei der Spezifität. So spaltet EndoH nur unmodifizierte bzw. mannosereiche und gemischte (hybride) Zuckerstrukturen ab, während PNGaseF nahezu alle Zuckerstrukturen, also auch die Komplexen, von Glykoproteinen hydrolysiert. Da erst im Golgi-Apparat die Zuckerstrukturen weiter modifiziert werden und so die verschiedenen Typen der N-Glykosylierung entstehen, weißt eine vollständige EndoH-Sensitivität auf eine Golgi bzw. prä-Golgi Lokalisation von LIMP-2-Varianten hin. Das mature, lysosomal lokalisierte LIMP-2 Protein trägt hauptsächlich

N-Glykosylierung des komplexen Typs, die gegenüber einer Spaltung durch EndoH resistent sind. Erst durch die Behandlung mit PNGaseF erfolgt eine vollständige Deglykosylierung, die im Coomassie-Gel bzw. im *Western-Blot* aufgrund der Größe des Polypeptidkerns nachgewiesen werden kann.

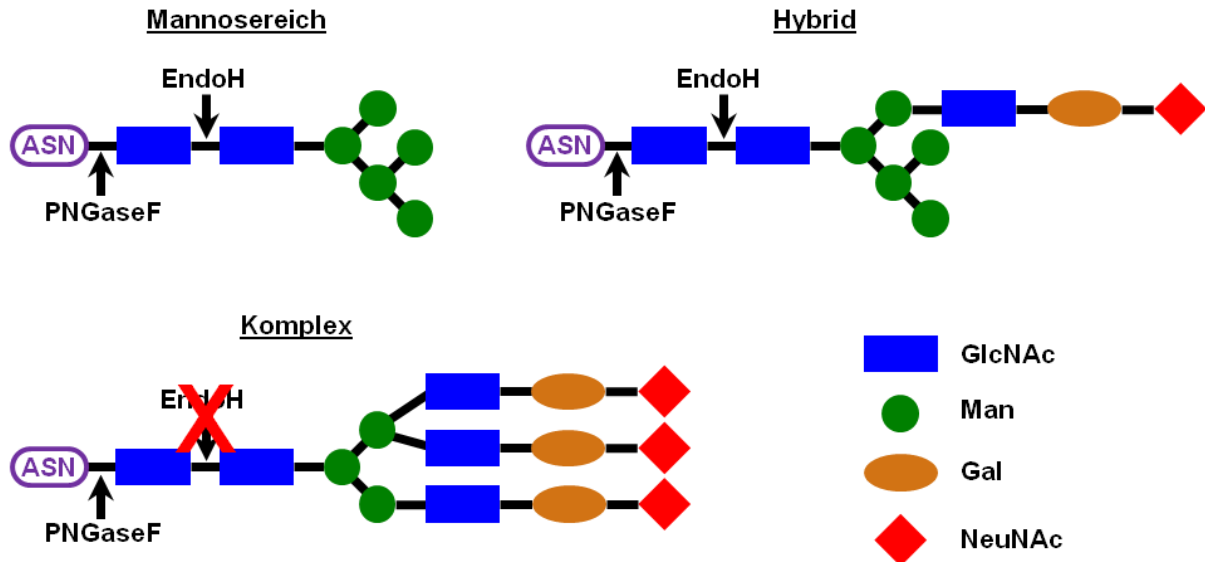


Abbildung 3.2-3: Schematische Darstellung der drei verschiedenen Glykosylierungstypen sowie der Schnittstellen und Spezifität von PNGaseF bzw. EndoH.

Während PNGaseF nahezu alle Typen an Glykosylierungen am Asparaginrest abspalten kann und dabei den Asparaginrest in einen Asparaginsäurerest überführt, werden von EndoH nur mannosereiche und hybride Glykosylierungsstrukturen an der $\beta(1-4)$ -Bindung zwischen den beiden ersten GlcNAc Resten des Kernoligosaccharids gespalten, wobei ein GlcNAc-Rest am Protein verbleibt. Der Verzweigungsgrad sowie die Länge der einzelnen Zuckerketten können innerhalb der einzelnen Typen variieren.

ASN = Asparagin; GlcNAc = N-Acetylglucosamin; Man = Mannose; Gal = Galaktose; NeuNAc = N-Acetylneuraminsäure

Modifiziert nach Lee *et al.*, 2009.

3.2.3.10.2 Deglykosylierung durch PNGaseF

Für die Analyse des Glykosylierungsmuster der überexprimierten LIMP-2-Konstrukte sowie endogener Proteine mit PNGaseF (Roche) wurden die Pellets der entsprechenden Zellen in 100 μ l PNGase Puffer I resuspendiert und durch zweimaliges Schallen im Ultraschallbad (Stufe 3, 90% Intervalldauer, 30 sec und 4°C) homogenisiert. Nach einem zehnminütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 upm und 4°C wurde das Proteinlysats (Überstand) in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Proteingehalt per BCA Assay bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.3.2). Das Volumen für 20 μ g wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und falls notwendig, mit PNGase Puffer I auf 10 μ l aufgefüllt. Zur Denaturierung wurde 1 μ l Mercaptoethanol hinzugefügt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach Zugabe von 90 μ l PNGase Puffer II wurde der Ansatz in zwei 50 μ l Aliquots geteilt. Die einen 50 μ l wurden mit 16,5 μ l red. 4 x Laemmli-Puffer versetzt und bei -20°C gelagert, zum zweiten 50 μ l Aliquot wurden 2 μ l PNGaseF [1 U/ μ l] gegeben und der Ansatz über Nacht bei 37°C im

Thermomischer schüttelnd inkubiert. Nach der Zugabe von 16,5 µl red. 4 x Laemmli-Puffer und dem Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten zusammen mit dem nicht behandeltem Aliquot, wurden diese per SDS-PAGE und *Western-Blot* (siehe Abschnitt 3.2.3.14) analysiert.

Die Deglykosylierung des bei der rekombinanten Expression der luminalen Domäne von LIMP-2 in HEK293-6E (siehe Abschnitt 3.2.3.6) gewonnen und über Ni-NTA gereinigten Materials (siehe Abschnitt 3.2.3.7) erfolgte mit der PNGaseF von NEB.

18 µl Proteinlösung wurden mit 2 µl 10 x *Glycoprotein Denaturing Buffer* (NEB) versetzt und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Danach wurden 4 µl 10 x *G7 Reaction Buffer* (NEB), 4 µl 10% NP40 (NEB) sowie 10 µl dH₂O zum Ansatz gegeben und dieser in zwei 19 µl Aliquots geteilt. Dem einem wurde 1 µl dH₂O und dem anderen 1 µl PNGaseF [500 U/µl] zugesetzt. Beide Ansätze wurden dann bei 37°C im Thermomischer schüttelnd für 1½ Stunden inkubiert, anschließend mit 6 µl red. 4 x Laemmli-Puffer versetzt und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Zur Analyse wurde eine 12,5%ige SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.2.3.14) und Coomassie Färbung (siehe Abschnitt 3.2.3.15) bzw. *Western-Blotting* verwendet.

3.2.3.10.3 Deglykosylierung durch EndoH

Für die Analyse des Glykosylierungsmuster der überexprimierten LIMP-2-Konstrukte sowie endogener Proteine mit EndoH (Roche) wurden die Pellets der entsprechenden Zellen in 100 µl EndoH Puffer I resuspendiert und durch zweimaliges Schallen im Ultraschallbad (Stufe 3, 90% Intervalldauer, 30 sec und 4°C) homogenisiert. Nach einem zehnminütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 upm und 4°C wurde das Proteinlysate (Überstand) in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Proteingehalt per BCA Assay bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.3.2). Das Volumen für 20 µg wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt, zur Denaturierung mit 1 µl Mercaptoethanol versetzt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach Auffüllen auf 100µl Gesamtvolumen mit EndoH Puffer II wurde der Ansatz in zwei 50 µl Aliquots geteilt. Die einen 50 µl wurden mit 16,5 µl red. 4 x Laemmli-Puffer versetzt und bei -20°C gelagert, zum zweiten 50 µl Aliquot wurden 2 µl EndoH [0,01 U/µl] gegeben und der Ansatz über Nacht bei 37°C im Thermomischer schüttelnd inkubiert. Nach der Zugabe von 16,5 µl red. 4 x Laemmli-Puffer und dem Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten zusammen mit dem nicht behandeltem Aliquot, wurden diese per SDS-PAGE und *Western-Blot* (siehe Abschnitt 3.2.3.14) analysiert.

Die Deglykosylierung des bei der rekombinanten Expression der luminalen Domäne von LIMP-2 in HEK293-6E (siehe Abschnitt 3.2.3.6) gewonnen und über Ni-NTA gereinigten Materials (siehe Abschnitt 3.2.3.7) erfolgte mit der EndoH_f von NEB.

18 µl Proteinlösung wurden mit 2 µl 10 x *Glycoprotein Denaturing Buffer* (NEB) versetzt und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Danach wurden 4 µl 10 x *G5 Reaction Buffer* (NEB) sowie 12 µl dH₂O zum Ansatz gegeben und dieser in zwei 18 µl Aliquots geteilt. Dem einem wurde 2 µl dH₂O und dem anderen 2 µl EndoH_f [1000 U/µl] zugesetzt. Beide Ansätze wurden dann bei 37°C im Thermomischer schüttelnd für 1½ Stunden inkubiert, anschließend mit 6 µl red. 4 x Laemmli-Puffer versetzt und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Zur Analyse wurde eine 12,5%ige SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.2.3.14) und Coomassie Färbung (siehe Abschnitt 3.2.3.15) bzw. *Western-Blotting* verwendet.

3.2.3.11 Fällung von Proteinen mittels TCA

Für die Fällung von Proteinen aus z.B. Zellkulturüberständen oder Gelfiltrations-Fraktionen (siehe 3.2.3.8) wurden 20% gesättigte Trichloressigsäure (100% (w/v) TCA in dH₂O; 500 g TCA / 350 ml dH₂O) zu der zu fällenden Proteinlösung gegeben. Das Volumen der Proteinlösung lag meist bei 1 ml sodass 250 µl TCA-Lösung in einem Eppendorfgefäß dazu gegeben wurde. Nach einer mindestens 45 minütigen Inkubation auf Eis, folgte ein erster Zentrifugationsschritt bei 31000g und 4°C für 30 Minuten. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen und erneut bei 31000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Wasch und Zentrifugationsschritt wurde nochmals wiederholt und das Pellet anschließend in der Speedvac getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde mit 1 x Lämmli-puffer aufgenommen, wobei das Volumen des Puffers der Pelletgröße angepasst wurde und zwischen 50 bis 200 µl betrug. Falls noch Restspuren von TCA im Pellet enthalten waren und sich dadurch der Lämmli-Puffer rot-gelblich verfärbte wurde 1 µl 1M NaOH zugesetzt. Nach Aufkochen der Proben für 10 Minuten bei 95°C konnten diese der PAGE (siehe 3.2.3.14.1) zugeführt werden.

3.2.3.12 Immunpräzipitation (IP) und Ko-Immunpräzipitation (CoIP) von Proteinen aus Zell-Lysaten

Die Homogenisierung der geernteten Zellpellets erfolgte analog zu 3.2.2.8 mittels Sonifikation im Ultraschallbad. Dazu wurde das Zellpellets in EBC-Puffer resuspendiert und anschließend die Zellen durch zweimaliges Schallen im Ultraschallbad (Stufe 3, 90% Intervalldauer, 30 sec und 4°C) aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 14000 upm und 4°C wurde der Überstand (Zelllysat bzw. Proteinlysat) in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Nach einer optionalen Proteinbestimmung (3.2.3.2) wurde entweder eine bestimmte Menge an Protein je Ansatz eingesetzt oder aber ohne Proteinbestimmung für alle Ansätze dasselbe Volumen gewählt. Das Proteinlysat wurde dann zusammen mit dem jeweiligen Antikörper für 12 bis 15 Stunden über Kopf bei 4°C rotieren gelassen. Optional konnte vorher noch ein *Preclearing* Waschschritt eingeschoben werden, bei dem equilibrierte Protein-G-Sepharose (s.u.) und das Proteinlysat ohne Antikörper für 1 Stunde bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert wurden. Nach Zentrifugation (1 Minute bei 3200 upm) wurde der Überstand dann mit dem Antikörper wie oben beschrieben inkubiert.

Für die Immunpräzipitation musste die verwendete Protein G-Sepharose der Firma Pierce/Thermo Fisher Scientific mit dem Lysispuffer equilibriert werden (vgl. 3.2.3.5). Dazu wurden je Ansatz 50 µl einer 50%igen Ethanol-Sepharoselösung verwendet. Nach Zentrifugation (1 Minuten bei 4000 upm) wurde der Ethanolüberstand verworfen und die Sepharose im Gesamtvolumen EBC-Lysispuffer aufgenommen. Nach zwei weiteren Waschschritten dieser Art wurde die sedimentierte Sepharose mit dem halben Gesamtvolumen an EBC-Puffer versetzt. Dadurch ergab sich nun eine 50%ige Lösung von Sepharose in EBC-Lysispuffer. Diese wurde nun in Eppendorfgefäße in 50 µl Aliquots aufgeteilt und nach Zentrifugation (1 Minute bei 3200 upm) und Verwerfen des Überstandes ergaben sich 25 µl Sepharosepellets. Zu diesen wurde nun das mit dem Antikörper inkubierte Proteinlysat hinzugegeben und für 1 Stunde über Kopf drehend bei 4°C oder RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen; 1 Minute bei 3200 upm zentrifugieren, Überstand abnehmen und aufheben bzw. verwerfen, Pellet mit 1 ml EBC Puffer versetzen, 10 Minuten bei RT drehend inkubieren; wurde das Pellet mit 100 µl reduzierendem 1 x Lämmli Puffer versetzt und für 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Nach 2 Minuten zentrifugieren bei 13000 upm wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Die Analyse der IP / CoIP erfolgte mittels SDS-PAGE und *Western-Blot* (3.2.3.14).

3.2.3.13 Quervernetzung (*Crosslink*) von Proteinen

Um eine potentielle Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von LIMP-2, wie auch die Bindung zum Liganden β -GC zu untersuchen und Aussagen über die Stöchiometrie des dabei entstehenden LIMP-2 / β -GC Komplexes treffen zu können, wurden sowohl Quervernetzungs- (*Crosslink*) Experimente in lebenden Zellsystemen, als auch in Zelllysaten und gereinigten Proteinlösungen vorgenommen. Die Analyse der entstandenen Reaktionsprodukte erfolgte anschließend per SDS-PAGE, Coomassie-Färbung (3.2.3.15) und *Western-Blot* (3.2.3.14).

Zum einen wurde dabei auf chemische homobifunktionale *Crosslinker* wie DSS und BS³ zurückgegriffen (Abbildung 3.2-4) und zum anderen photoreaktive Aminosäuren (Abbildung 3.2-6) eingesetzt, mit denen ein unmittelbares Quervernetzen der Proteine in der lebenden Zelle möglich ist (Suchanek et al., 2005).

Das lipophile membrangängige Disuccinimidylsuberat (DSS; Suberinsäure-bis(N-hydroxysuccinimidester)) ist ein nichtspaltbarer, Amin reaktiver, homobifunktionaler *Crosslinker* aus der Klasse der N-hydroxysuccinimidester (NHS Ester) mit einer *Spacerarm*-Länge von 11,4 Å (1140 pm), die in etwa 9 Atombindungen entspricht. Das hydrophile Sulfoanalog zu DSS ist BS³.

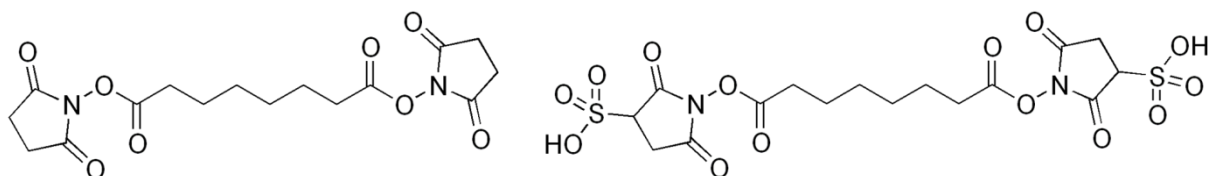


Abbildung 3.2-4: Struktur der chemischen *Crosslinker* DSS (links) und BS³ (rechts).

Quelle: Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook 2009.

NHS Ester reagieren mit primären Aminen, wie sie in der Seitenkette der Aminosäure Lysin bzw. am n-Terminus des Proteins vorkommen, in schwach alkalischem Milieu (pH 7 bis 9) unter Ausbildung einer kovalenten Amidbindung und der Freisetzung von N-hydroxysuccinimid (siehe Abbildung 3.2-5). Ein erfolgreicher *Crosslink* hängt dabei u.a. von der *Spacerarm*-Länge und dem Vorhandensein der reaktiven Gruppen, hier Lysinresten, im Bindungs-*Interface* ab.

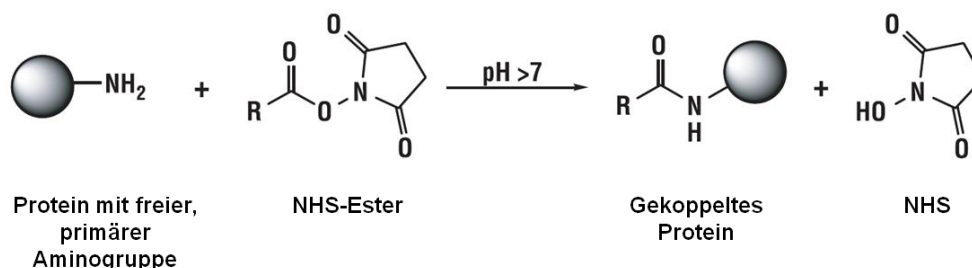


Abbildung 3.2-5: *Crosslink*-Reaktions Schema der NHS-Ester.

Verändert nach Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook 2009.

Die beiden Aminosäuren-Derivate L-Photo-Leucin und L-Photo-Methionin (Abbildung 3.2-6) werden anstelle ihrer natürlichen Analoga in neusynthetisierte Proteine eingebaut. In ihren Seitenketten ist ein Diazirin-Ring enthalten, der bei der Photolyse in Stickstoff und eine reaktive Carben-Zwischenstufe überführt wird (Abbildung 3.2-6). Diese Carben-Zwischenstufe addiert als starkes Elektrophil in Peptidbindungen und Aminosäuren-Seitenketten von eng benachbarten Proteinen bzw. Interaktionspartnern. Die *Spacerarm*-Länge beträgt dabei nur eine Atombindung und ist somit wesentlich kürzer als beim *Crosslink* mit DSS oder BS³. Des Weiteren hat diese Methoden den Vorteil, dass sie spezifischer als der klassische chemische *Crosslink* ist, da das entstehende Carben-Intermediat nur von kurzer Lebenszeit ist. Limitierend sind nur die räumliche Nähe der beiden Proteine und das Vorhandensein eines Leucin oder Methionin-Restes im Bindungs-*Interface*. Wobei auch die Einbaurrate der Aminosäurenderivate hoch genug sein muss, was aber durch einen Konzentrationsüberschuss dieser im Zellkulturmedium erreicht wird.

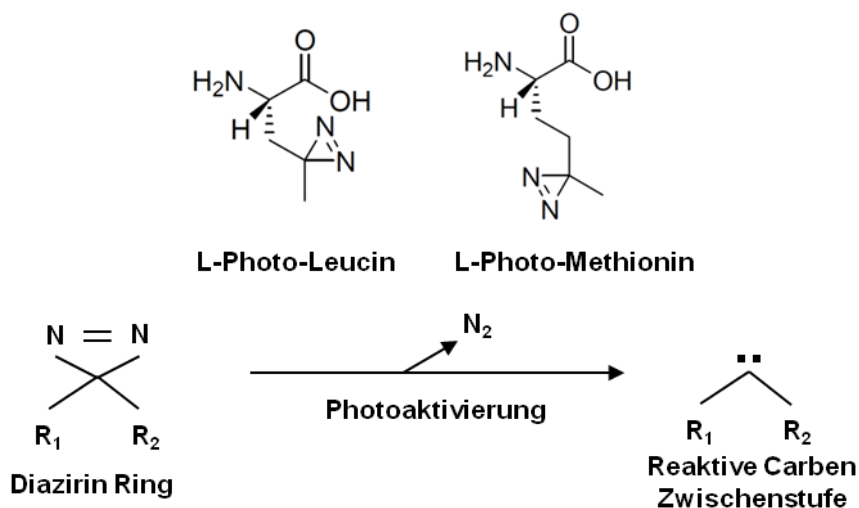


Abbildung 3.2-6: Struktur der Aminosäuren-Derivate Photo-Leucin und Photo-Methionin (oben) sowie Reaktionsmechanismus zur Darstellung der reaktiven Carben-Zwischenstufe (unten).

3.2.3.13.1 Intrazellulärer Crosslink von Proteinen mit DSS

Für den intrazellulären *Crosslink* zum Nachweis einer LIMP-2 Dimerbildung bzw. eines LIMP-2 β -GC Komplexes wurden sowohl murinen LIMP-2 defiziente und β -GC defiziente sowie die entsprechenden Kontroll-Fibroblasten als auch COS-7 Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und bis zur 100%igen Konfluenz kultiviert. Da die *Crosslink* Reaktion nur in neutralem bzw. schwach alkalischem pH-Bereich vonstattengeht und LIMP-2 unter *steady-state* Bedingung zu 95% im Lysosom lokalisiert ist, musste vor dem *Crosslink* der lysosomale pH-Wert neutralisiert werden. Dies erfolgte durch eine sechsstündige Inkubation mit Bafilomycin A1 (20 μ l/ml Medium; Stock-Lsg. 10 μ M in DMSO). Bafilomycin A1 inhibiert spezifisch die lysosomale V-Typ-H⁺-ATPase und verhindert somit

die Ansäuerung des lysosomalen Kompartimentes. Nach dreimaligen Waschen der Zellen mit kaltem EBSS/HEPES Puffer (25 mM pH 7,4) wurde zu den *Crosslink*-Ansätzen 2 ml 0,54 mM DSS/DMSO in EBSS/HEPES Puffer (25 mM pH 7,4) und zu den Kontrollansätzen 2 ml 5% DMSO in EBSS/HEPES Puffer (25 mM pH 7,4) gegeben und diese dann für 30 Minuten bei 37°C im Zell-Brutschrank inkubiert. Danach wurde die *Crosslink*- sowie Kontroll-Reagenz auf Eis abgesaugt und die Zellen mit jeweils 2 ml Stopp-Lösung (20 mM Ethanolamin in kaltem EBSS/HEPES(25 mM pH 7,4) in den Zellkulturschalen bedeckt. Nach 15 minütiger Inkubationszeit auf Eis und dreimaligen Waschen der Zellen mit kaltem EBSS/HEPES Puffer (25 mM pH 7,4) wurden die Zellen wie unter Abschnitt 3.2.2.7 beschrieben mit 1 ml HEPES/EBSS-Puffer / Complete geerntet und anschließend gemäß Abschnitt 3.2.2.8 mit EBC-Puffer homogenisiert. Optional wurden die vernetzten Produkte über eine IP bzw. CoIP (3.2.3.12) gereinigt bzw. aufkonzentriert. Die Analyse der *Crosslink*-Reaktionsprodukte erfolgte mittels SDS-PAGE und *Western-Blot* (3.2.3.14).

3.2.3.13.2 Crosslink in gereinigten Proteinlysaten mit BS³

Das Volumen für je 11 µg des durch Affinitäts- (3.2.3.7) und Größenausschlusschromatographie (3.2.3.8) gereinigten Sekretionsprotein der luminalen Domäne von LIMP-2 bzw. von rekonstituierter Cerezyme[®] β-GC wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben. Diese Menge entsprach bei einer Proteingröße von 55kDa (= 55000g/mol) je nach Proteinkonzentration einer Molarität von 2 bzw. 5 µM ($M [\text{mol/l}] = c [\text{g/l}] \div m_M [\text{g/mol}]$). Von einer 10 mM BS³ Stammlösung ausgehend wurde das Volumen für einen 25fachen (0,125 mM final) bzw. 100fachen (0,5 mM final) molaren Überschuss an BS³ Crosslinker zu einem Ansatz gegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit einem 100fach molaren (50 mM final) Überschuss an Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5, gegenüber BS³ *Crosslinker* *gequencht*. Bei den Kontrollansätzen wurde zuerst die BS³ *Crosslinker* Lösung mit der entsprechenden Menge an *Quencher* versetzt und dann zur Proteinlösung gegeben. Abschließend wurden die Ansätze mit dem entsprechenden Volumen an reduzierenden 4fach Lämmli Puffer versetzt und bei 95°C für 10 Minuten aufgekocht. Bis zur Analyse per *Western-Blot* (3.2.3.14) wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.2.3.13.3 Direkter Crosslink in der lebenden Zelle mittels Photo-Aminosäure Derivaten

Für den endogenen *Crosslink* von LIMP-2 oder nach Überexpression entsprechender LIMP-2 Konstrukte im Zellkultursystem wurden die verschiedenen Zellarten in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und bis idealerweise zur 80-90%igen Konfluenz in *HighGlucose*-DMEM-Medium kultiviert. Nach einem Waschschrift mit sterilen 1fach PBS und zweifachem Waschen mit DMEM minus Leucin/Methionin (-LM) Medium, dem 10% dialysiertes FCS (diaFCS) sowie Pen/Strep (PS) zugesetzt waren, wurden jeweils 2 ml Labelmedium (DMEM-LM; 10% diaFCS; PS; 3 mM PhotoLeu und 1,5 mM PhotoMet, jeweils wässrige 25 mg/ml Stocklösung) zu den Zellen gegeben und diese dann für 24 Stunden weiter kultiviert. Alternativ konnte die Aussaat der Zellen auch schon direkt ins Labelmedium erfolgen, dazu wurden 2 ml Labelmedium vorgelegt und die Zellen so ausgesät, dass sie am Folgetag, 24 Stunden post Aussaat, eine Konfluenz von 100% erreicht hatten. In beiden Fällen erfolgte nach 24stündiger Labelphase und einmaligem Waschen mit semisterilen 1fach PBS die Bestrahlung der mit 2 ml 1fach PBS überschichteten Zellen mit UV-Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 365 \text{ nm}$ für 15 Minuten, gemäß dem Herstellerprotokoll. Währenddessen wurden die Kontrollansätze, bei denen keine UV-Bestrahlung stattfand, geerntet und pelletiert (3.2.2.7). Die Ernte der bestrahlten Zellen erfolgte analog dazu. Nach Homogenisieren (3.2.2.8) und Proteinbestimmung im Lysat (3.2.3.2) wurden verschiedenen Ansätze einer SDS-PAGE unterworfen und per *Western-Blot* (3.2.3.14) analysiert. Abbildung 3.2-7 zeigt nochmal schematisch den Ablauf dieser *Crosslink*-Methode.

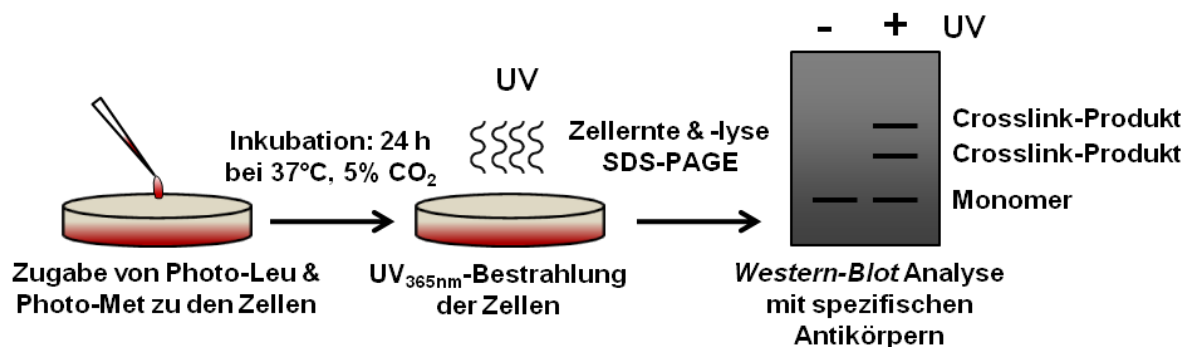


Abbildung 3.2-7: Schematischer Ablauf des Crosslinks mit Photo-Aminosäuren.

Verändert nach <http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=D3005300-40EB-42E7-9A4D-1250BB4EDA0E>.

3.2.3.14 Western-Blot Analyse

Die Gesamtmethode „*Western-Blot*“ setzt sich aus folgenden Einzelschritten zusammen: Auftrennung der Proteine in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, dem Transfer auf Membranen und der Immundetektion der transferierten Proteine.

3.2.3.14.1 SDS-, Tris-Acetat- und Bis-Tris-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE und NuPAGE)

Mit Hilfe der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Dies wird dadurch erreicht, dass vor der Auftrennung die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch die Zugabe von Lämmli-Puffer, dem darin enthaltenem SDS (Natriumdodecylsulfat) und dem zehnminütigem Erhitzen auf 65 bzw. 95°C aufgebrochen wird. Durch einen Überschuss des anionischen Tensids SDS wird des Weiteren die durch die geladenen Aminosäureseitenketten hervorgerufene Eigenladung der Proteine überlagert und eine konstante negative Ladungsverteilung erreicht, so dass die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld nicht mehr von der Ladung ihrer Seitenketten abhängt, sondern idealerweise nur noch von ihrem Molekulargewicht. Bei der reduzierenden PAGE werden zusätzlich die intra- und intermolekularen Disulfidbrücken durch Behandlung mit β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) und der dadurch resultierenden Reduktion gespalten. Es gibt allerdings auch Proteinkomplexe die eine SDS-Resistenz aufweisen und nicht denaturiert werden können (Manning and Colón, 2004). Ebenso kann es und dies ist v.a. bei Membranproteinen ein Problem durch zu starke Erhitzung zur Aggregation der Proteine kommen, so dass diese mit einem höheren Molekulargewicht erscheinen. Die in der PAGE aufgetrennten Proteine können entweder in einem weiteren Schritt auf eine Membran *geblottet* werden (PVDF oder Nitrozellulose) und dann mit entsprechenden Antikörpern immunologisch detektiert werden (*Western-Blot* 3.2.3.14.3) oder aber in den Gelen durch Coomassie- oder Silber-Färbung (3.2.3.15) sichtbar gemacht werden. Je nach Fragestellung wurden verschiedene Varianten der PAGE eingesetzt, zum einem die diskontinuierliche SDS-PAGE mit selbstgegossenen Gelen (siehe unten) oder aber auf Bis-Tris bzw. Tris-Acetat beruhende PAGE Fertigellsysteme (NuPage System der Firma Invitrogen/LifeTechnologies) mit einem festen Polyacrylamid-Anteil im Gel (7 oder 10%) oder einem Polyacrylamid-Prozentgradienten (z.B. 4-20% oder 3-8%), der zu einem größeren Auftrennungsbereich führt. Die kommerziellen Gele wurden zumeist auch mit einem speziellen auf die Gele abgestimmten Puffersystem verwendet, z.B. Tris-Acetat-SDS-, MES oder MOPS-Laufpuffer, durch die zusätzlich die Trenneigenschaften ein wenig modifiziert

bzw. variiert werden konnten. Eine Übersicht über die verwendeten Fertiggele findet sich im Abschnitt 3.1.4.

Die selbsthergestellten SDS-PA-Gele bestanden aus zwei unterschiedlichen übereinander geschichteten Polyacrylamidgelen, die sich in ihrem pH-Wert und ihrer durch den Vernetzungsgrad bedingten Porengröße unterschieden: dem grobporigen Sammelgel (pH 6,8) und dem engmaschigen Trenngel (pH 8,8). Das Sammelgel, in dessen Taschen die jeweiligen Probenansätze geladen wurden, diente der Sammlung der Proteine in einer scharfen Proteinbande beim Übergang in das Trenngel, in dem letztendlich die Trennung der Proteine erfolgte. Die Gele wurden aus den Monomeren Acrylamid und N, N'-Methylen-bisacrylamid (Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1), Carl Roth GmbH + Co. KG) sowie aus Tetramethyldiamin (TEMED), Ammoniumperoxidsulfat (APS) und dem jeweiligen SDS-haltigen Gelpuffer hergestellt. Das APS, das als ein Radikalkettenstarter fungiert, initiiert dabei die Polymerisation und Vernetzung der Acrylamid-Monomere.

Während der Polyacrylamid Anteil in den Trenngelen je nach zu detektierender Proteingröße bei 8% bis 15% lag, betrug er im Sammelgel immer 4,5%. Die Dicke der Gele hing von der auf die PAGE folgende Analyse-Methode ab, beim *Western-Blot*, bei dem es auf maximale Proteinmenge ankam, betrug sie 1,5 mm, während die Gele für Coomassie-Färbungen nur eine Dicke von 0,75 mm hatten.

Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei mit 70%igen Ethanol gesäuberten senkrechten Glasplatten (Biorad System), die in einer Gießvorrichtung eingespannt waren, bis etwa 1,5 cm unter den oberen Rand der Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, wurde das Isopropanol entfernt. Das Sammelgel wurde dann auf das Trenngel gegossen und für die Aussparung der Taschen ein Kamm (10 oder 15 Zinken) zügig eingesteckt. Dieser konnte nach Aushärten des Sammelgels wieder entfernt und das Gel mitsamt den Glasplatten aus der Gießvorrichtung genommen werden. Entweder wurde das Gel dann bis zu seiner Verwendung in feuchten Tüchern eingeschlagen bei 4°C gelagert oder aber in die Auftrennkammer des Mini-Protean 3-Elektrophorese-Systems (Biorad) gesetzt. Nach Einsetzen des Gels bzw. zweier Gele wurden die beiden Kammern mit SDS-PAGE Laufpuffer, der als Elektrolyt fungiert, gefüllt und das jeweilige Gel mit den denaturierten Proteinproben beladen. Das Auftragsvolumen lag zwischen 20 und 65 µl mit einer Proteinmenge von 5 bis 40 µg je Tasche. Nach Anlegen einer konstanten elektrischen Spannung von 100 bis 145 Volt erfolgte die Wanderung der Proteine durch das Gel, das wie ein Sieb wirkte. Proteine mit niedrigem Molekulargewicht durchlaufen dabei das Gel schneller als solche mit einem hohen Gewicht. Um die Größen abschätzen bzw. verifizieren

zu können, wurden zusätzlich 5-10 µl eines Molekulargewichtsmarkers (*Page Ruler Prestained Plus*, Fermentas) in eine Tasche mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde nach dem Rauslaufen der blauen Laufrichtung nach im Mittel 120 Minuten gestoppt.

3.2.3.14.2 Transfer von aufgetrennten Proteinen auf Membranen

Für den immunologischen Nachweis bestimmter Proteine in der mit der PAGE aufgetrennten Proteingesamtheit wurden diese elektrophoretisch auf Membranen transferiert. Dabei wird das in der PAGE aufgetrennte Proteingemisch durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf die entsprechende Membran transferiert.

Dabei wurden für die sogenannte *Semi-Dry-Blot-Technik* PVDF-Membranen und bei der Nass-Methode, dem *Tank-Blot* (Bittner et al., 1980), Nitrozellulose Membranen verwendet. Die Bindung der Proteine an die Membran beruht in beiden Fällen auf hydrophoben Wechselwirkungen.

Beim *Semi-Dry-Blot* wurden zuerst zwei in Transferpuffer getränkte *Whatman*-Papierstücke von gleicher Größe wie die Membran (6 x 9 cm) auf die Blotapparatur gelegt. Auf die Filterpapierstücke kam die in 100%igem Methanol und Transferpuffer equilibrierte PVDF-Membran. Auf die Membran wurden dann das für 15 Minuten in Transferpuffer gespülte PAGE-Gel sowie nochmals zwei getränkte *Whatman*-Papierstücke gelegt. Dabei war auf einen luftblasenfreien Zusammenbau des *Blots* zu achten. Der Transfer wurde bei einer konstanten Spannung von 15 V für bis zu 45 Minuten vollzogen. Die sich anschließende immunologische Detektion der transferierten Proteine ist im Abschnitt 3.2.3.14.3 beschrieben.

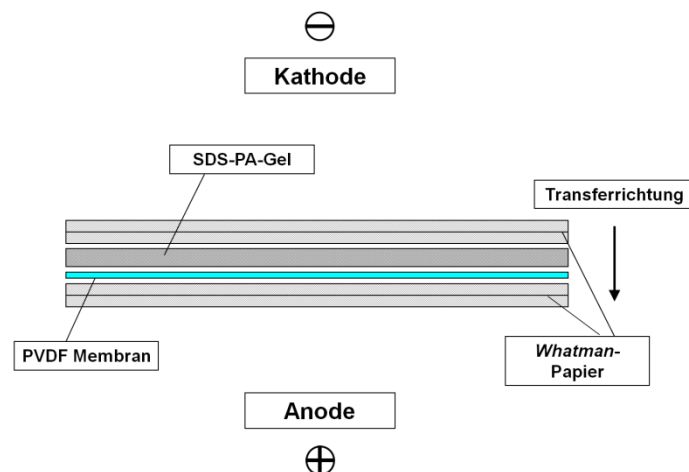


Abbildung 3.2-8: Schematischer Aufbau *Semi-Dry-Blot*.

Während beim *Semi-Dry-Blot* der Transfer der Proteine horizontal von Kathode zur Anode erfolgte, sind beim *Tank-Blot* die Elektroden vertikal in einem Puffertank angeordnet, so dass das PAGE-Gel und die Membran in einer Kassette zwischen je zwei Filterpapieren und Vliesstücken luftblasenfrei eingeklemmt werden mussten. Diese Kassette wurde in den mit

Blotpuffer gefüllten *Blotting*-Tank zwischen Kathode und Anode platziert. Der Transfer der Proteine auf die immobilisierende Nitrozellulose-Membran erfolgt somit vertikal. Transferiert wird bei ausreichender Kühlung bei 4°C und ständiger Umwälzung des Puffers bei einer konstanten Stromspannung von 20 V für 15 bis 18 Stunden. Anschließend erfolgte die Immundetektion der transferierten Proteine.

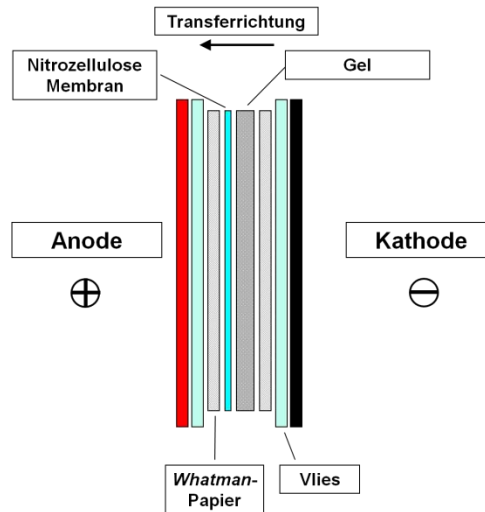


Abbildung 3.2-9: Schematischer Aufbau *Tank-Blot*.

3.2.3.14.3 Immundetektion der transferierten Proteine

Sowohl beim *Semi-Dry*- als auch beim *Tank-Blot* wurde nach dem Transfer der Proteine auf die Membran, diese mit 5%igem Milchpulver/TBST Puffer für mindestens 45 Minuten bei RT geblockt, um eine Absättigung der restlichen Proteinbindungsstellen zu erreichen und unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Es folgte die 1½stündige Inkubation auf dem Rollmischer bei RT mit den Primärantikörpern, die gemäß 3.1.11 in 5 ml 5%igem Milchpulver/TBST Puffer in einem 50 ml Sarstedtröhrchen angesetzt wurden und je nach Antikörper bis zu sechsmal wiederverwendet wurden. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer für je 10 Minuten, wurde die Membran mit der frisch hergestellten Sekundärantikörper-Lösung (HRP-gekoppelt) eine Stunde bei RT schüttelnd inkubiert. Die Durchführung der Meerrettichperoxidase-katalysierten Chemolumineszenzreaktion nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST erfolgte mit einem ECL-Kit (ECL plus bzw. ECL *advanced Western-Blotting Detection System* der Firma Amersham/GE Healthcare). Die sich ergebenden Signale wurden mit Hilfe eines Chemolumineszenzkamerasystems visualisiert (LAS 4000 *Photoimager*-Systems) und dokumentiert. Der Aufnahme-Modus (*Increment* oder *Precision*) und die Expositionszeiten (0,5 Sekunden bis zu 3 Minuten) hingen dabei von der jeweiligen Signalstärke ab.

3.2.3.15 Coomassie Färbung von PAGE-Gelen

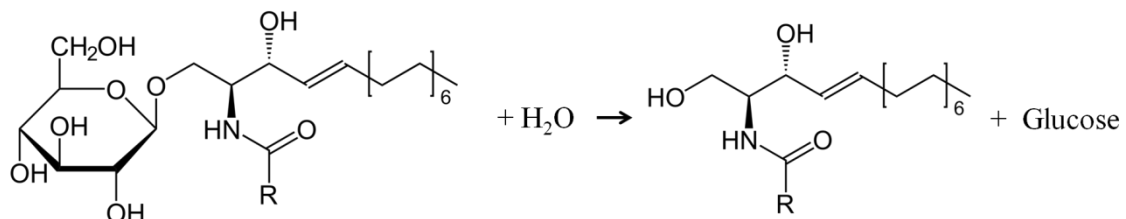
Für die Färbung von Proteinen in PAGE-Gelen wurden meist Gele mit einer Dicke von 0,75 mm verwendet, da bei diesen der Färbe- und Entfärbeprozess wesentlich schneller verlief als bei Gelen mit einer Dicke von 1,5 mm. Das Gel wurde nach der Gelelektrophorese dreimal 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in dH₂O gewaschen und anschließend mit 15 ml *PageBlue* Lösung (Fermentas / Thermo Fisher Scientific) bedeckt und mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Die Proteinfärbung mit *PageBlue* basiert auf kolloidalem Coomassie G-250 (Neuhoff et al., 1988). Danach wurde die Färbelösung abgenommen und aufgehoben, da sie bis zu dreimal wiederverwendet werden konnte. Das Gel wurde sodann durch ausreichendes Waschen mit dH₂O soweit entfärbt, dass sich die angefärbten Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben.

Das gefärbte Gel wurde zwischen zwei klare Folien gelegt und eingescannt. Die Bandenintensität wurde bei Bedarf nach Grauskalierung in Adobe Photoshop Elements mit der ImageQuant Software des LAS 4000 *Photoimager*-Systems quantifiziert. Die Lagerung der eingescannten Gele erfolgte bei 4°C.

3.2.3.16 Aktivitätsbestimmung von β -Glucocerebrosidase

Durch β -Glucocerebrosidase wird im Lysosom die hydrolytische Spaltung der β -glykosidischen Verbindung zwischen D-Glukose und Ceramid katalysiert (siehe Abbildung 3.2-10 A).

A



B

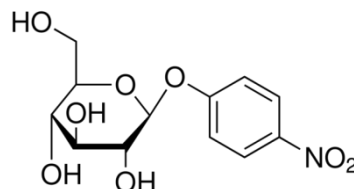


Abbildung 3.2-10: (A) Durch β -GC katalysierte Reaktion. (B) Struktur des Substratanalogons 4-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid.

Mit dem synthetischen Substratanalogon 4-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (siehe Abbildung 3.2-10 B) konnte die Enzymaktivität von β -Glucocerebrosidase in Fraktionen der Größenausschlusschromatographie (3.2.3.8) und den Proben der Peptid-Bindeversuche

(3.2.3.5) bestimmt werden. Gemessen wurde dabei die Menge an freigesetztem p-Nitrophenol, die der Enzymaktivität entsprach.

In Eppendorfgefäßen wurden je 10 µl Probe in Doppelansätzen mit 100 µl Substrat (10 mM 4-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid in 0,2 M Citratpuffer) versetzt. Als Leerwert wurde je Probe ein Ansatz bestehend aus 10 µl Probe und 100 µl Citratpuffer eingesetzt, sowie für den gesamten Assay ein Substratleerwert aus 100 µl Substrat und 10 µl Citratpuffer bzw. Probenpuffer. Die Inkubation erfolgte für 120 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 750 µl Stopplösung beendet und je Ansatz 161 µl in Doppelwerten in die *Wells* einer 96 *well* Mikrotiterplatte überführt. Durch die Messung des im basischen gelblichen p-Nitrophenols bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$ (Extinktionskoeffizient $e_{\beta\text{-GC}}$: 18,5 [l/(mmol•cm)]) ergibt sich die Enzymaktivität der β-Glucocerebrosidase durch:

$$a_{\beta\text{-GC}} [\text{mU/ml}] = \Delta E \cdot ((1000 \cdot V_{\text{total}}) / (e_{\beta\text{-GC}} \cdot V_{\text{Probe}} \cdot t)) \quad \text{mit:} \quad \Delta E = E_{\text{Probe}} - E_{\text{Probenleerwert}}$$

V_{total} = Ansatz Gesamtvolumen in ml (0,86 ml)

V_{Probe} = Probenvolumen in ml (0,01 ml)

t = Inkubationszeit in Minuten (120 Minuten)

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Glykosylierungsstellen innerhalb der luminalen Domäne von LIMP-2

Da bisher noch keine strukturellen Informationen über die Faltung des luminalen Bereiches des LIMP-2 Proteins vorlagen, wurde ein auf der Primärsequenz beruhendes Faltungsmodell dieses Bereiches auf Basis eines Datenbankabgleichs bekannter Faltungsstrukturen postuliert (siehe Abbildung 4.1-1; Groth, 2007). Die schon begonnene Verifizierung dieses Modells sollte durch die Analyse der Nutzung potentieller N-Glykosylierungsstellen in dieser Arbeit fortgeführt werden. Das Konzept hinter dieser Untersuchung bestand darin, dass genutzte, also glykosyliert vorliegende N-Glykosylierungsstellen an der Oberfläche des Faltungsmodells liegen müssen und nicht im Inneren des Strukturmodells. Das LIMP-2 Strukturmodell umfasst neun der elf potentiellen N-Gly-kosylierungsstellen des murinen LIMP-2 Proteins.

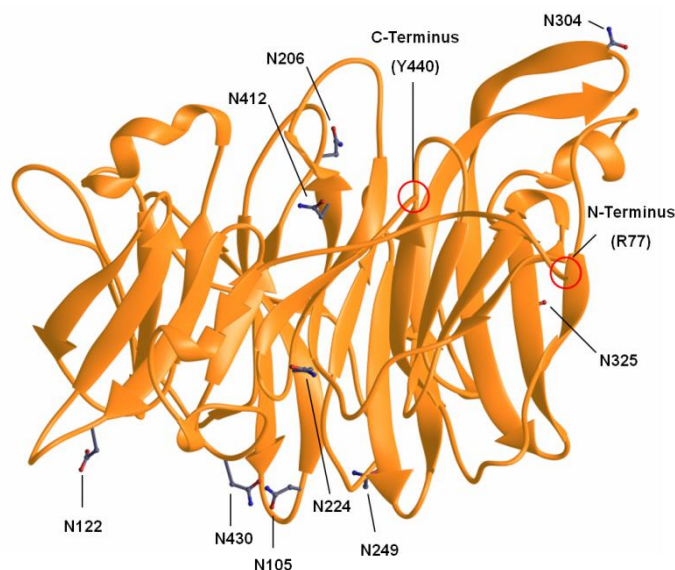


Abbildung 4.1-1: Bändermodell der luminalen Domäne von LIMP-2.

Die Asparagine der neun potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind als Stab- und Kugelmodell visualisiert (modifiziert nach J.Groth, 2007).

Um nun die Nutzung einzelner potentieller N-Glykosylierungsstellen nachzuweisen, wurde ausgehend von einer murinen LIMP-2 Variante, bei der alle elf Asparaginreste [N] der potentiellen N-Glykosylierungsstellen zu Alaninen [A] mutiert sind (LIMP-2-11xNA; siehe Groth, 2007), jede N-Glykosylierungsstelle einzeln für sich wieder in diese eingefügt (siehe Abbildung 4.1-2 B und C). Diese Konstrukte wurden danach in COS-7 Zellen exprimiert und anschließend nach Deglykosylierung mit der Endoglykosidase F (PNGaseF) mittels SDS-PAGE und *Western-Blot* Analyse untersucht. Falls durch einen eingefügten Asparaginrest die

wiederhergestellte N-Glykosylierungsstelle genutzt wurde, sollte ein entsprechender Unterschied des apparenten Molekulargewichts im *Western-Blot* zwischen PNGaseF inkubierten und nicht inkubierten Ansatz zu beobachten sein.

Die LIMP-2 Varianten mit nur einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle waren jedoch nicht lysosomal lokalisiert, sondern verblieben im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) (siehe 4.1.1.2). Daher wurden in einer zweiten Analyse LIMP-2 Varianten generiert, denen jeweils nur eine der potentiellen N-Glykosylierungsstellen fehlte. Dazu wurden die Asparaginreste der elf potentiellen N-Glykosylierungsstellen jeweils einzeln durch Glutamine [Q] ersetzt. Somit ergaben sich elf verschiedene LIMP-2 Varianten, die noch über jeweils zehn potentielle N-Glykosylierungsstellen verfügten (siehe Abbildung 4.1-2 D). Diese wurden ebenfalls in verschiedenen Zellkultursystemen wie COS-7 und Hela Zellen sowie LIMP-2 defizienten murinen embryonalen Fibroblasten exprimiert und ihre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz überprüft. Ob an einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle eine Kohlenhydratkette verknüpft war oder nicht, konnte in diesem Fall durch den eventuell zu beobachtenden Unterschied des apparenten Molekulargewichts der Variante gegenüber dem LIMP-2 Wildtyp Protein im *Western-Blot* entschieden werden. Erfolgte normalerweise an einer Stelle eine Glykosylierung, würde die entsprechende LIMP-2 Variante ein geringeres Molekulargewicht gegenüber dem vollständig glykosylierten Wildtyp Protein aufweisen.

Über die Verifizierung des Strukturmodells hinaus sollte auch der Einfluss einzelner potentieller N-Glykosylierungsstellen auf das LIMP-2 Protein untersucht werden. Ähnliche Studien wurden auch schon für die mit LIMP-2 verwandten Proteine SR-BI (Viñals et al., 2002) und CD36 (Hoosdally et al., 2009) durchgeführt.

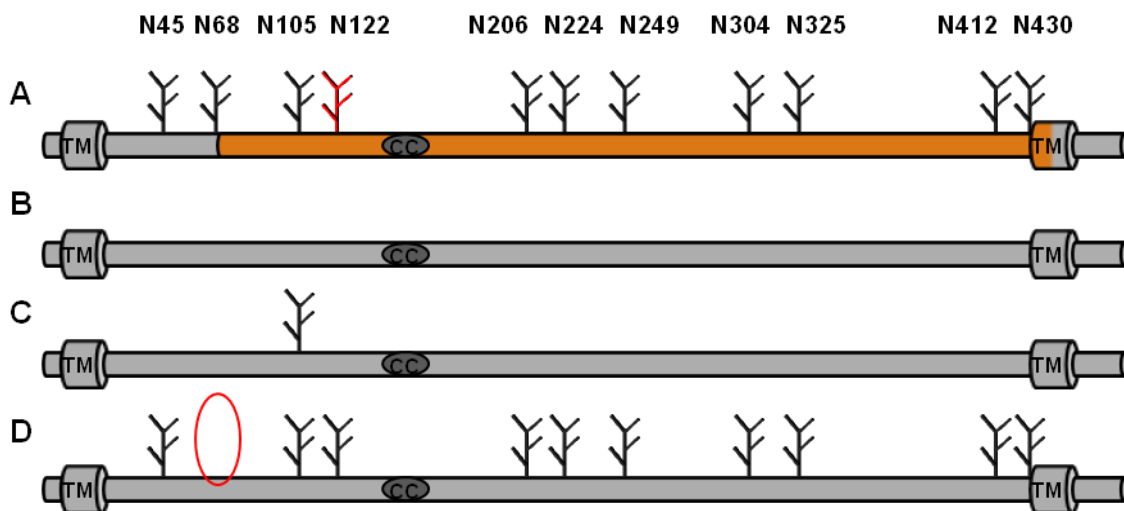


Abbildung 4.1-2: Schematische Darstellung der verschiedenen murinen LIMP-2 Glykosylierungsvarianten.

(A) Schematische Darstellung des murinen LIMP-2 Wildtyps mit der Lage der elf potentiellen N-Glykosylierungsstellen (Aminosäureabfolge NX[S/T] (wobei X weder ein Prolin [P] noch Asparaginsäure [D] sein darf). Die Nummerierung der jeweiligen Asparaginreste basiert auf der murinen Primärsequenz. Die in

der humanen Sequenz nicht konservierte Glykosylierungsstelle N122 ist in rot hervorgehoben. Der Bereich von LIMP-2, der dem Modell der luminalen Domäne entspricht, ist in orange eingefärbt. Gut zu erkennen ist, dass dieser Bereich auch einen Teil der C-terminalen Transmembrandomäne (TM) umfasst. Das in dunkelgrau unterlegte CC steht für die *coiled-coil* Domäne und ihrer Lage innerhalb des LIMP-2 Proteins.

(B) LIMP-2-11xNA, die LIMP-2 Variante, bei der alle Asparaginreste (N) der Erkennungssequenzen der potentiellen N-Glykosylierungsstellen zu Alaninen mutiert sind und somit keine N-Glykosylierung des Polypeptidkerns erfolgen kann.

(C) Repräsentatives Beispiel für die LIMP-2 Varianten mit nur einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle (hier LIMP-2-11xNA_A105N), bei denen ausgehend von der in (B) dargestellten nicht glykosylierfähigen LIMP-2 Variante jeweils eine der elf potentiellen N-Glykosylierungsstelle durch Reinsertion des Asparaginrestes wiederhergestellt ist.

(D) Repräsentatives Beispiel für eine der LIMP-2 Varianten, die durch Austausch eines Asparaginrestes gegen ein Glutamin nur noch über zehn potentielle N-Glykosylierungsstellen verfügt. Die Position der ausgetauschten Stelle (N68Q) ist mit einem roten Oval gekennzeichnet.

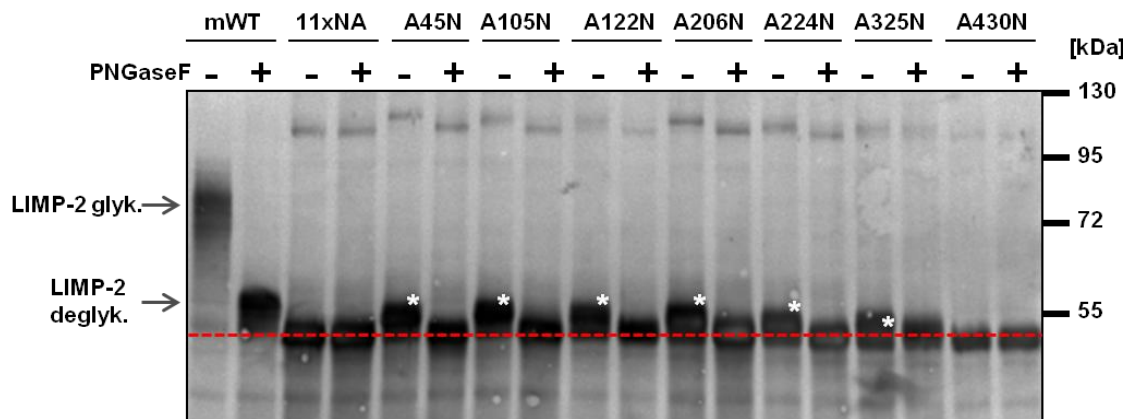
4.1.1 Der Einzel-Glykosylierungsstellen-Ansatz

4.1.1.1 PNGaseF und Western-Blot Ergebnisse

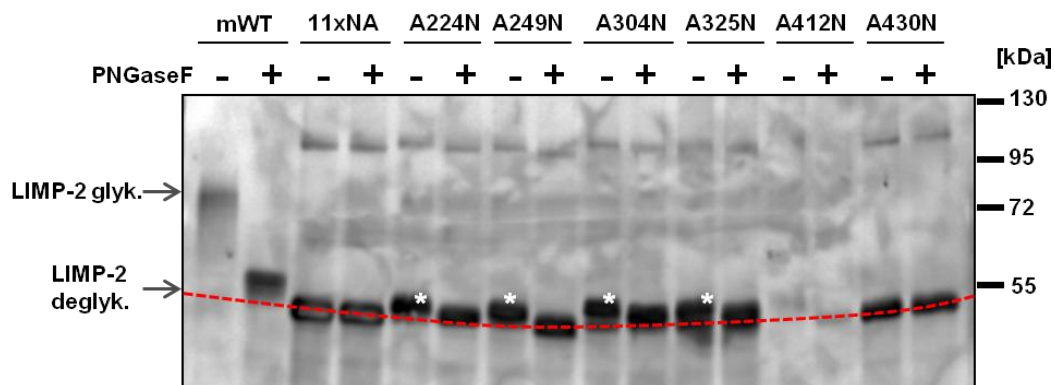
Nach der erfolgreichen Klonierung aller elf LIMP-2 Varianten mit nur jeweils einer reinsertierten N-Glykosylierungsstelle, konnten alle Konstrukte in COS-7 Zellen zur Expression gebracht werden und im *Western-Blot* über das Myc-Tag detektiert werden (siehe Abbildung 4.1-3). Die vorherige Behandlung mit PNGaseF führte zur vollständigen Deglykosylierung der Proteine. Während sich dies beim LIMP-2 Wildtyp Protein in einem Unterschied des apparenten Molekulargewichts von ca. 30 kDa widerspiegelte, fiel dieser Unterschied bei den LIMP-2 Varianten geringer aus. Generell beträgt das zusätzliche Molekulargewicht aufgrund einer N-Glykosylierung nur bis zu 3 kDa (Helenius and Aebi, 2004). Mittels hochauflösender denaturierender SDS-PAGE und anschließender Detektion im *Western-Blot* konnte jedoch dieser Molekulargewichtsunterschied zwischen dem jeweiligen deglykosylierten Protein und dem unbehandelten aufgetrennt werden. Zur Kontrolle wurden zum einen das LIMP-2 Wildtyp Protein und zum anderen die nicht glykosylierfähige LIMP-2-11xNA Variante mitgeführt. Durch die LIMP-2-11xNA Variante wurde dabei die Laufhöhe des unglykosylierten Polypeptidkerns festgelegt. Die Auswertung der *Western-Blots* ergab, dass, bis auf die in der LIMP-2 Sequenz kurz vor der C-terminalen Transmembrandomäne gelegene potentielle N-Glykosylierungsstelle N430, alle anderen zehn potentiellen N-Glykosylierungsstellen glykosyliert vorlagen (siehe Abbildung 4.1-3). Die entsprechenden Banden sind in der Abbildung 4.1-3 (A bis C) durch einen weißen Stern gekennzeichnet.

Ergebnisse

A



B



C

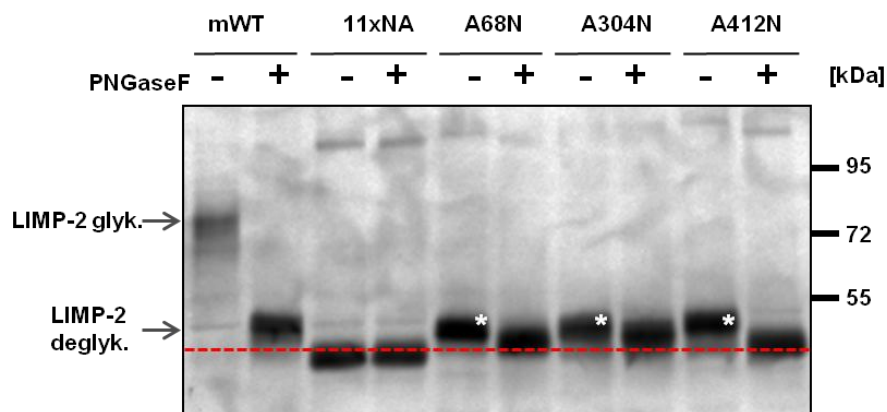


Abbildung 4.1-3: Western-Blot Ergebnisse: PNGaseF-Experimente der LIMP-2 Mutanten mit jeweils einer re-inserierten Glykosylierungsstelle.

(A bis C): Bis auf LIMP-2-A430N zeigen alle restlichen zehn LIMP-2 Varianten mit jeweils einer re-inserierten potentiellen N-Glykosylierungsstelle ein unterschiedliches apparentes Molekulargewicht zwischen PNGaseF behandeltem (+) und unbehandeltem Ansatz (-). Einige LIMP-2 Varianten weisen dabei im unbehandelten Ansatz eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Doppelbande auf, die für das Vorliegen einer un- und einer glykosylierten Form der Variante spricht.

Die gestrichelte rote Linie markiert jeweils die Laufhöhe des unglykosylierten LIMP-2 Polypeptidkerns. Im Falle des Blot B ist zu erkennen, dass die Lauffront aufgrund von Geleffekten nicht gerade verlief sondern gekrümmt.

Die weißen Sterne zeigen die LIMP-2 Varianten an, bei denen ein Unterschied im Laufverhalten zwischen unbehandelten und mit PNGaseF behandelten Ansätzen festgestellt werden konnte. Im unbehandelten Ansatz liegt die Proteinbande oberhalb der roten Linie. Dieser Unterschied im Molekulargewicht ist auf eine Glykosylierung an dem jeweils re-inserierten Asparagin zurückzuführen. Die jeweilige potentielle N-Glykosylierungsstelle ist also zugänglich und wird genutzt. Wildtyp LIMP-2 (mWT) und die nicht glykosylierfähige LIMP-2 Variante (11xNA) sind als Kontrollen mitgeführt. Alle verwendeten LIMP-2 Konstrukte verfügen über ein C-terminales Myc-Tag.

4.1.1.2 LIMP-2 Varianten mit nur einer Glykosylierungsstelle sind nicht lysosomal lokalisiert

Im Zuge der Charakterisierung der LIMP-2 Varianten mit nur einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle wurde deren Lokalisation in der Zelle mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Dabei sollte überprüft werden, ob die beschriebene rER Lokalisation für die nicht glykosylierfähige LIMP-2-11xNA Variante (Groth, 2007) durch die Re-Insertion einer der elf potentiellen N-Glykosylierungsstellen behoben werden kann. Es stellte sich jedoch heraus, dass alle elf untersuchten LIMP-2 Varianten ebenfalls im rER lokalisiert waren und nicht lysosomal (siehe Abbildung 4.1-4). Dies sprach dafür, dass für die korrekte Lokalisierung von LIMP-2 bzw. für die korrekte Faltung des Proteins eine Glykosylierung, die über eine einzelne genutzte N-Glykosylierungsstelle hinausgeht, unablässig ist.

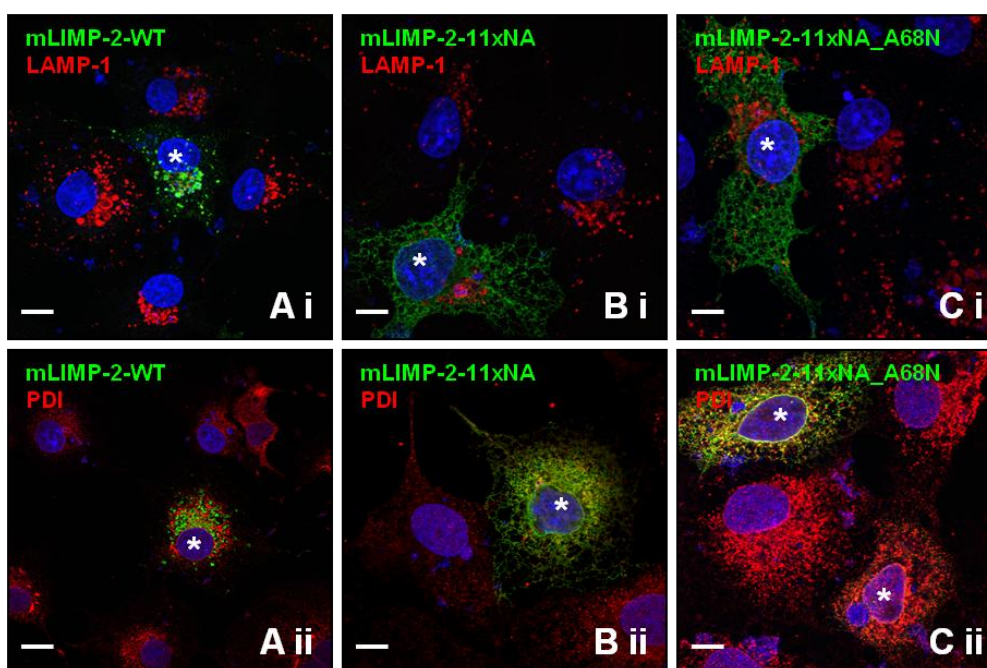


Abbildung 4.1-4: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der LIMP-2 Varianten mit nur einer N-Glykosylierungsstelle in COS-7 Zellen.

(A) LIMP-2 Wildtyp; (B) LIMP-2 Variante ohne jegliche N-Glykosylierungsstellen (LIMP-2-11xNA) und (C) LIMP-2 mit der re-inserierten N-Glykosylierungsstelle N68 (LIMP-2-11xNA_A68N) als Repräsentant für die Einzel-Glykosylierungsvarianten von LIMP-2.

(i) Ko-Färbung mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1 (roter Kanal). (ii) Ko-Färbung mit der Protein Disulfid Isomerase (PDI) als rER Markerprotein (roter Kanal).

Während das Wildtyp Protein eine Ko-Lokalisation mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1 aufweist, sind sowohl die nicht glykosylierfähige als auch die nur über eine potentielle N-Glykosylierungsstelle verfügende LIMP-2 Variante im rER lokalisiert.

Bei allen verwendeten LIMP-2 Konstrukten handelt es sich um die murinen Varianten, die zusätzlich über ein C-terminales Myc-Tag verfügen. Transfizierte Zellen sind durch einen weißen Stern markiert. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung sind in Abschnitt 3.1.11 tabelliert. Maßstabsbalken: 10 µm.

4.1.2 Der Einzel-Austausch-Ansatz

4.1.2.1 PNGaseF und *Western-Blot* Ergebnisse: Neun von elf potentiellen N-Glykosylierungsstellen werden genutzt

Es sollte im Folgenden überprüft werden, ob die gezeigte Nutzung der einzelnen N-Glykosylierungsstellen eventuell auf die rER Lokalisation der entsprechenden Konstrukte zurückzuführen und somit artifizieller Natur war (siehe 4.1.1).

Daher wurden LIMP-2 Varianten kloniert, denen durch den Austausch des Asparagins gegen ein Glutamin (siehe Abbildung 4.1-5) in der Erkennungssequenz jeweils nur eine N-Glykosylierungsstelle fehlte (siehe Abbildung 4.1-2 D).

Darüber hinaus sollten diese Varianten dazu genutzt werden, um N-Glykosylierungsstellen zu identifizieren, die einen besonderen Einfluss auf LIMP-2 hinsichtlich Faltung und oder Lokalisation haben könnten.

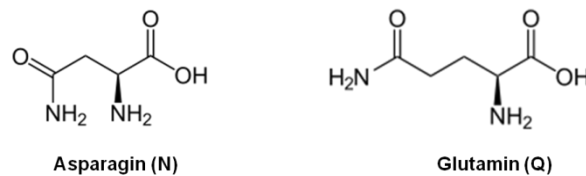


Abbildung 4.1-5: Struktur der beiden L-Aminosäuren Asparagin und Glutamin.

Während ein Asparagin in der N-Glykosylierungserkennungssequenz NX[S/T] (wobei X weder ein Prolin P noch Asparaginsäure D sein darf) mit einer Kohlenhydratkette verknüpft wird, erfolgt dies bei der nur um eine CH₂ Gruppe in der Seitenkette längeren Aminosäure Glutamin nicht.

Die klonierten LIMP-2 Varianten wurden sowohl in COS-7 und Hela Zellen als auch in LIMP-2 defizienten murinen Fibroblasten exprimiert, um einen möglichen zelltypspezifischen Einfluss auf die Glykosylierung ausschließen zu können. In allen drei Zelltypen konnten übereinstimmende Ergebnisse in den *Western-Blot* und Immunfluoreszenz Analysen gewonnen werden. Es zeigte sich in den *Western-Blot* Studien, dass, wie schon in der Einzel-Glykosylierungsanalyse (4.1.1), N430 nicht glykosyliert vorlag. Dahingegen wurde für die zuvor als „genutzt“ identifizierte N-Glykosylierungsstelle N122, bei der es sich um eine nicht konservierte potentielle N-Glykosylierungsstelle handelt, keinerlei Glykosylierung festgestellt (vgl. Abbildung 4.1-10 und 4.1-11). Sowohl das LIMP-2 Wildtyp Protein als auch die LIMP-2-N122Q Variante ließen sich im *Western-Blot* mit einem gleichen apparenten Molekulargewicht detektieren. Mit Ausnahme von LIMP-2-N430Q zeigten alle anderen neun LIMP-2 Einzelaustausch-Varianten ein erniedrigtes Molekulargewicht gegenüber dem Wildtyp Protein. Der Unterschied im apparenten Molekulargewicht gegenüber dem LIMP-2 Wildtyp Protein war teilweise aber nur marginal (Abbildung 4.1-6). Repräsentativ für die drei

untersuchten Zelllinien sind in Abbildung 4.1-6 die Ergebnisse aus den Hela Zellen dargestellt.

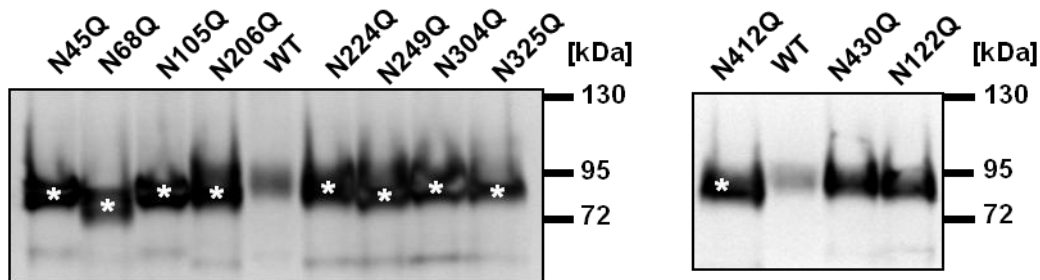


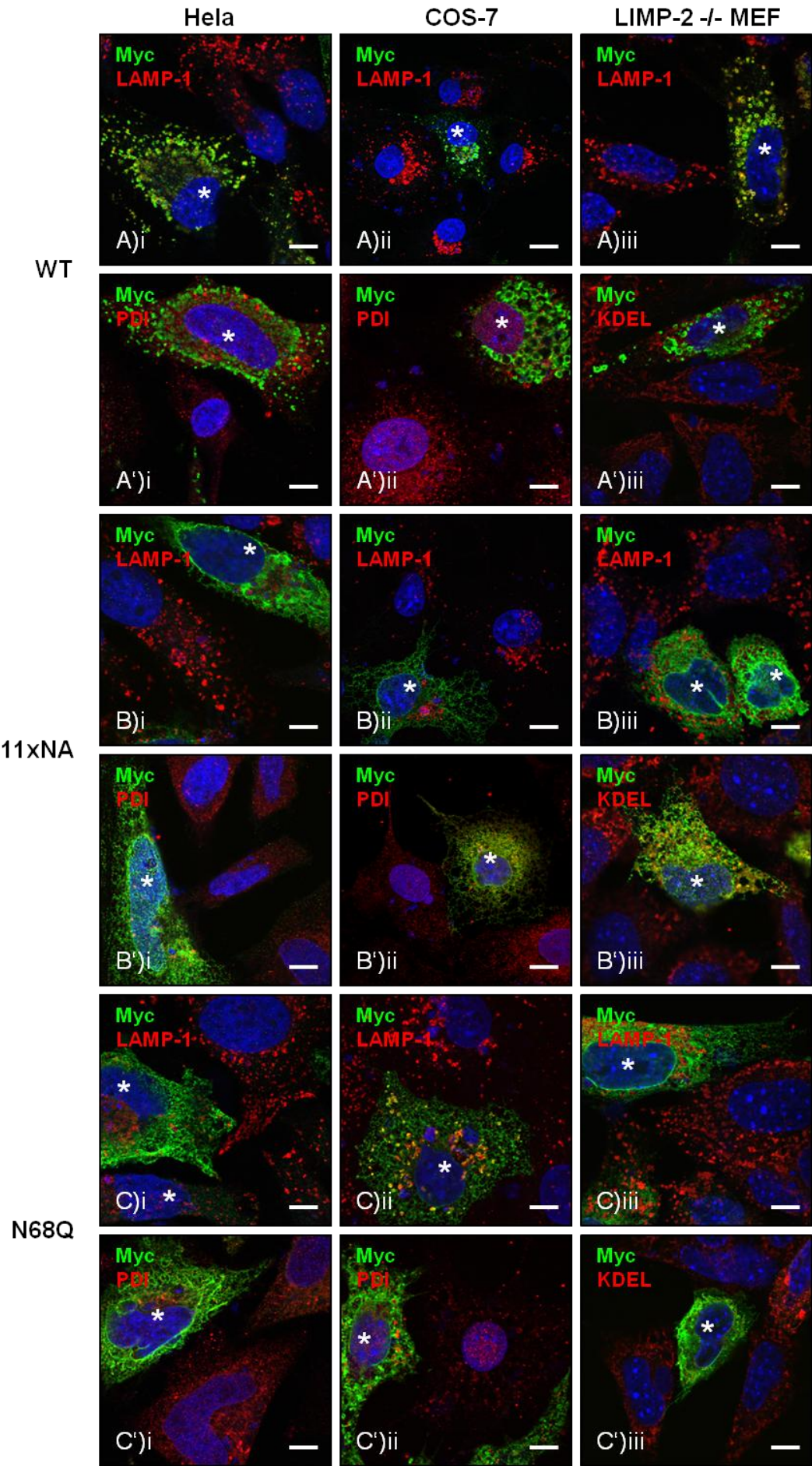
Abbildung 4.1-6: Vergleich der Laufeigenschaften von in Hela Zellen exprimierten LIMP-2 Varianten mit jeweils einer entnommenen potentiellen N-Glykosylierungsstelle gegenüber LIMP-2 Wildtyp - Western-Blot Ergebnisse.

Bis auf N430Q und N122Q zeigen alle restlichen neun LIMP-2 Glycosylierungsvarianten ein erniedrigtes apparentes Molekulargewicht gegenüber dem als Kontrolle mitgeführten LIMP-2 Wildtyp (WT) Protein (Banden mit Sternchen gekennzeichnet). Dies ist auf das Fehlen einer Kohlenhydratkette an der jeweiligen potentiellen N-Glykosylierungsstelle zurückzuführen.

4.1.2.2 Die herausragende Rolle der Glykosylierung des Asparaginrestes N68 von LIMP-2

In einem nächsten Schritt wurde die Lokalisation der LIMP-2-NQ Varianten in der Zelle mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Verlust einer einzelnen N-Glykosylierungsstelle toleriert wurde. Die LIMP-2 Varianten wiesen die gleiche korrekte lysosomale vesikuläre Lokalisation wie das LIMP-2 Wildtyp Protein auf, wie durch die Ko-Lokalisation mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1 gezeigt werden konnte. Dies galt jedoch nicht für alle N-Glykosylierungsstellen. So war die LIMP-2-N68Q Variante wie die LIMP-2 Varianten mit nur einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle (siehe 4.1.1.2) im rER lokalisiert. Eine Auswahl repräsentativer Immunfluoreszenzbilder für die Lokalisation in drei verschiedenen Zelllinien ist in Abbildung 4.1-7 aufgeführt.

Die rER Lokalisation von LIMP-2-N68Q ist deutlich zu erkennen. Eine Überprüfung dieser Lokalisation erfolgte durch Ko-Lokalisationsstudien mit dem ER-Markerprotein PDI bzw. durch die Anfärbung KDEL-Sequenz tragender Proteine (Abbildung 4.1-7). Einige Konstrukte zeigten zwar eine etwas erhöhte rER Lokalisation (siehe Übersichtstabelle 4.1-1), aber kein anderer Einzelaustausch einer Glykosylierungsstelle führte zur vollständigen rER Lokalisation. Damit könnte die N-Glykosylierungsstelle am Asparagin N68 eine Schlüsselrolle bei der Faltung des Proteins spielen. Scheinbar ist eine Glykosylierung an N68 zwingend notwendig, reicht aber alleine nicht aus (siehe Abschnitt 4.1.1.2) um eine korrekte Faltung und Lokalisation von LIMP-2 zu garantieren.



Ergebnisse

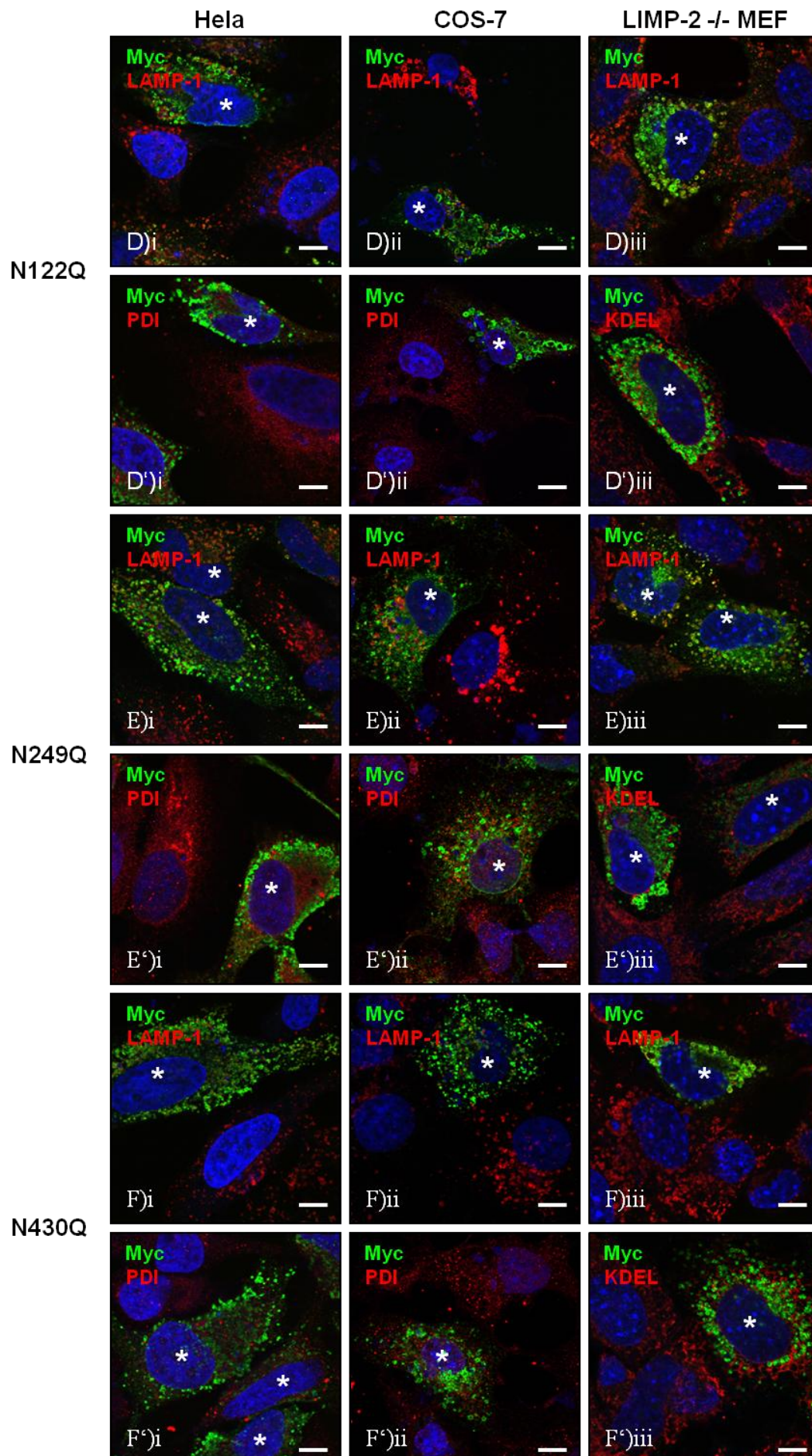


Abbildung 4.1-7: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der LIMP-2 Varianten mit je einer ausgetauschten N-Glykosylierungsstelle in HeLa und COS-7 Zellen sowie in LIMP-2 ^{-/-} MEFs.

Bis auf LIMP-2-N68Q (C) und der zur Kontrolle mitgeführten LIMP-2 Variante ohne jegliche Glykosylierungsstelle (LIMP-2-11xNA) (B) weisen alle anderen LIMP-2 Einzelaustausch-Varianten dieselbe lysosomale Lokalisation wie das LIMP-2 Wildtyp Protein (A) auf.

Bei allen verwendeten LIMP-2 Konstrukten handelt es sich um die murinen Varianten, die zusätzlich über ein C-terminales Myc-Tag verfügen. Transfizierte Zellen sind durch einen weißen Stern markiert.

(A bis F) Ko-Färbung mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1 (roter Kanal)

(A' bis F') Ko-Färbung mit der Protein Disulfid Isomerase (PDI) bzw. gegen die KDEL Sequenz als rER Marker (roter Kanal).

i = HeLa; ii = COS-7; iii = LIMP-2 defiziente MEF.

Die eingesetzten primären und sekundären Antikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung sind in Abschnitt 3.1.11 tabelliert. Maßstabsbalken: 10 µm.

4.1.3 LIMP-2 weist eine partielle EndoH Sensitivität auf

Bei der Behandlung von Zellhomogenaten mit PNGaseF und EndoH wurde für LIMP-2 eine partielle EndoH Sensitivität festgestellt (repräsentativ in COS-7 Zellen siehe Abbildung 4.1-8). Dies deutet darauf hin, dass einige der N-Glykosylierungen nach ihrer ko-translationalen Verknüpfung an das naszierende Protein im Golgi-Apparat nicht weiter modifiziert wurden (siehe Methodenteil 3.2.3.10). Im Falle von LIMP-2 könnte entweder die Bindung der β -GC bzw. eine LIMP-2 Dimerisierung ursächlich dafür sein, dass die entsprechenden Glykosylierungen maskiert sind. Eine andere Erklärung wäre, dass nach der vollständigen Faltung des Proteins die entsprechenden Glykosylierungen für die modifizierenden Enzyme im Golgi-Apparat nicht mehr zugänglich sind.

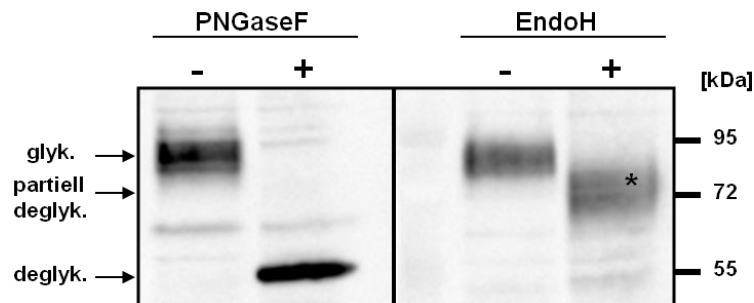


Abbildung 4.1-8: Western-Blot: PNGaseF und EndoH Deglykosylierung von endogenem LIMP-2 aus COS-7 Zellen.

Lysosomal lokalisiertes LIMP-2 ist endogen nicht vollständig resistent gegen eine EndoH Behandlung sondern zeigt eine partielle Deglykosylierung, erkennbar durch die Lage der Bande (EndoH (+), schwarzer Stern) zwischen den unbehandelten Ansätzen (-) und der durch PNGaseF vollständig deglykosylierten Probe (PNGaseF (+)).

4.1.4 Identifikation der EndoH resistenten und sensitiven N-Glykosylierungsstellen von LIMP-2

Da die Deglykosylierung mit EndoH einem „alles oder nichts“ Prinzip folgt, kann eine teilweise Sensitivität aller Glykosylierungsstellen nicht vorliegen. Vielmehr sind nur einzelne Stellen sensitiv. Um diese Stellen zu identifizieren und daraus eventuelle Rückschlüsse hinsichtlich der Lage der β -GC Interaktions- bzw. der Dimersierungsdomäne oder aber der Faltungstopologie ziehen zu können, wurde das Verhalten der Einzelaustausch-Varianten

Ergebnisse

(s.o.) von LIMP-2 nach EndoH Behandlung mittels *Western-Blot* analysiert. Die Abbildung 4.1-9 verdeutlicht das Schema hinter der Auswertung dieses Ansatzes.

Durch den Abgleich des im *Western-Blot* detektierten apparenten Molekulargewichts der LIMP-2 Einzelaustausch-Varianten nach partieller EndoH Deglykosylierung mit dem des LIMP-2 Wildtyp Proteins kann eine Identifizierung EndoH resistenter und EndoH sensibler N-Glykosylierungsstellen erfolgen. Ist das apparente Molekulargewicht der partiell deglykosylierten LIMP-2 Variante (+ EndoH) geringer als das des ebenfalls partiell deglykosylierten LIMP-2 Wildtyp Proteins, ist die in der LIMP-2 Variante entfernte N-Glykosylierungsstelle im Wildtyp Protein EndoH resistent. Weist aber die Variante nach EndoH Behandlung dasselbe apparente Molekulargewicht wie das Wildtyp Protein auf, liegt die entfernte N-Glykosylierungsstelle im Wildtyp-Protein EndoH sensitiv vor. Voraussetzung für die Analyse ist, dass die entsprechende potentielle N-Glykosylierungsstelle genutzt wird und dass die betrachteten LIMP-2 Varianten jeweils lysosomal lokalisiert sind. Ansonsten würde z.B. bei rER Lokalisation eine vollständige EndoH Sensitivität vorliegen.

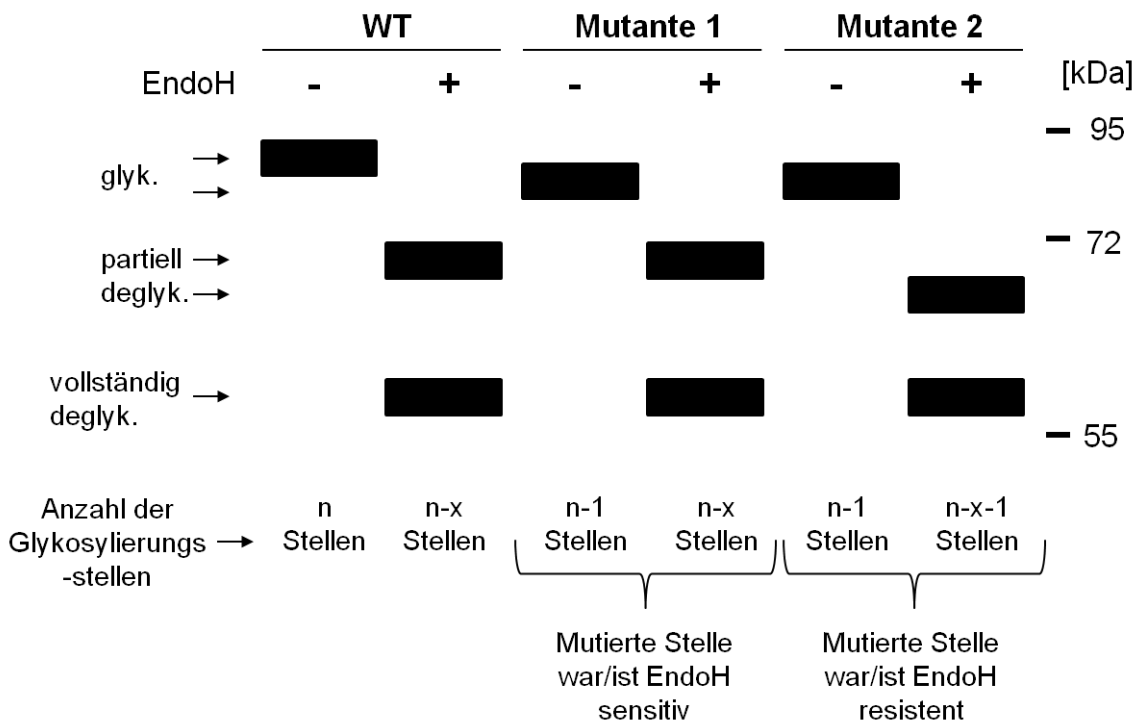


Abbildung 4.1-9: Schematische Darstellung der Auswertung der Deglykosylierung mittels EndoH zur Identifizierung EndoH resistenter bzw. sensibler N-Glykosylierungsstellen von LIMP-2.

Das im *Western-Blot* detektierte apparente Molekulargewicht des LIMP-2 Wildtyp Proteins (WT (-)) setzt sich aus dem Molekulargewicht für den Polypeptidkern und dem der Kohlenhydratketten an den ‚n‘ genutzten Glykosylierungsstellen zusammen. Durch die EndoH Behandlung erfolgt für das mature Wildtyp Protein nur eine partielle Deglykosylierung (*Western-Blot* Spur (WT (+))). Das im *Western-Blot* erkennbare apparente Molekulargewicht enthält demnach auch noch den Kohlenhydratketten-Gewichtsanteil von ‚n-x‘ EndoH resistenten Glykosylierungsstellen. Hier steht ‚x‘ für die Anzahl der EndoH sensiblen Glykosylierungsstellen, die durch die EndoH Behandlung deglykosyliert wurden.

Ergebnisse

Durch die Entfernung je einer Glykosylierungsstelle enthalten die LIMP-2 Mutanten jeweils nur noch ‚n-1‘ Glykosylierungsstellen und zeigen somit ein erniedrigtes apparentes Molekulargewicht gegenüber dem Wildtyp Protein, wenn diese Glykosylierungsstelle im Wildtyp Protein normalerweise glykosyliert ist. Betrachtet man Mutante 1, die nach EndoH Behandlung (Spur (+)) ein dem Wildtyp Protein vergleichbares apparentes Molekulargewicht aufweist, heißt das, dass immer noch ‚n-x‘ Glykosylierungsstellen glykosyliert vorliegen müssen und damit EndoH resistent sind. Die entfernte Glykosylierungsstelle trägt somit nicht zum Molekulargewicht dieses partiell deglykosylierten Proteins bei und muss demnach EndoH sensitiv sein. Anders verhält es sich im Falle der Mutante 2. Hier weist das partiell deglykosylierte Protein ein gegenüber dem Wildtyp Protein und der Mutante 1 erniedrigtes apparentes Molekulargewicht auf. Demnach muß die in dieser Mutante entfernte Glykosylierungsstelle normalerweise zum erhöhten Molekulargewicht des partiell deglykosylierten Wildtyp Proteins beigetragen haben und somit EndoH resistent sein. Zu beachten ist, dass aufgrund der Überexpression neben der murenen lysosomalen Population auch immer eine nicht vollständig ausmatuierte Proteinpopulation im rER vorhanden ist. Diese ist vollständig EndoH sensitiv und erscheint nach EndoH Deglykosylierung als vollständig deglykosyliertes Signal im *Western-Blot*.

Wie in Abbildung 4.1-10 zu erkennen ist, konnten nach Anwendung des obigen Auswerteschemas mit N45, N105 und N304 drei N-Glykosylierungsstellen von LIMP-2 als EndoH resistent identifiziert werden. Nach EndoH Behandlung wiesen die entsprechenden partiell deglykosylierten LIMP-2 Einzelaustausch-Varianten ein geringeres apparentes Molekulargewicht als das partiell deglykosylierte LIMP-2 Wildtyp Protein auf. Die Glykosylierungsstelle N68 konnte aufgrund der vollständigen EndoH Sensitivität der entsprechenden LIMP-2-N68Q Variante, die mit deren rER Lokalisation korrespondiert, nicht charakterisiert werden.

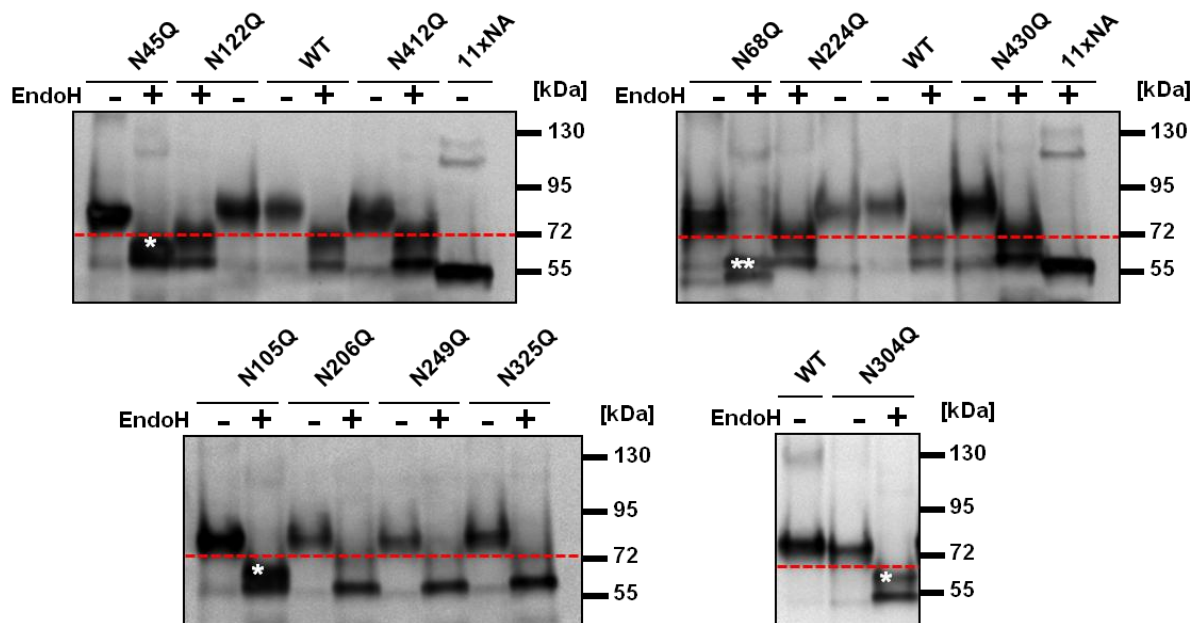


Abbildung 4.1-10: Western-Blots: EndoH Behandlung der in COS-7 Zellen exprimierten Einzelaustausch-Varianten von LIMP-2.

Die mit einem weißen Stern gekennzeichneten Glykosylierungsstellen konnten mit der in Abbildung 4.1-9 dargelegten Annahme eindeutig als resistent gegenüber EndoH identifiziert werden. Diese so gekennzeichneten LIMP-2 Varianten zeigen nach EndoH Behandlung (+) ein erniedrigtes apparentes Molekulargewicht für das partiell deglykosylierte Protein im Vergleich mit dem LIMP-2 Wildtyp Protein und den anderen LIMP-2 Varianten, deren Laufhöhe durch die gestrichelte rote Linie markiert ist. Eine Sonderrolle nimmt LIMP-2-N68Q ein, da diese Variante im rER lokalisiert ist (siehe Abbildung 4.1-7) und eine vollständige EndoH Sensitivität aufweist. Dadurch ist eine Aussage über die Natur dieser Glykosylierungsstelle nicht möglich. Als weitere Kontrolle ist die nicht glykosylierfähige LIMP-2-11xNA Variante mitgeführt, die die Laufhöhe des nicht glykosylierten bzw. vollständig deglykosylierten Polypeptidkerns des Proteins festlegt.

Ergebnisse

In der Tabelle 4.1-1 sind abschließend alle gewonnenen Erkenntnisse zusammengestellt. Die Nutzung der potentiellen N-Glykosylierungsstellen in den verwendeten LIMP-2 Varianten, die auf der murinen Aminosäuresequenz beruhen, wurden dabei mit den in der UniprotKB Datenbank hinterlegten Informationen für die humane Variante von LIMP-2 (Q14108; SCRB2_HUMAN) abgeglichen bzw. gegenübergestellt.

Tabelle 4.1-1: Übersicht über die Ergebnisse der Analyse der potentiellen N-Glykosylierungen des murinen LIMP-2 Proteins.

Tabelliert ist, ob die potentielle N-Glykosylierungsstelle von LIMP-2 in der jeweiligen Glykosylierungsvariante von LIMP-2 glykosyliert vorlag. Weiterhin ist die zelluläre Lokalisation und das Verhalten der jeweiligen LIMP-2-NQ Variante gegenüber einer Deglykosylierung mit EndoH sowie die daraus resultierende Konsequenz für die jeweilige potentielle N-Glykosylierungsstelle.

Potentielle N-Glykosylierungs-stelle (mLIMP-2 Sequenz)	Nutzung in der 11xNA_A...N Variante (vgl. 4.1.1)	Nutzung in der NQ Variante (vgl. 4.1.2)	Nutzung laut UniprotKB	Verhalten der NQ Variante gegenüber EndoH (vgl. 4.1.4)	Verhalten der N-Glyk.Stelle gegenüber EndoH (vgl. 4.1.4)	Lokalisation der LIMP-2-NQ Variante (vgl. 4.1.2.2)
N45	Ja	Ja	Ja	teilsensitiv	resistent	lysosomal
N68	Ja	Ja	Ja	sensitiv	k.A.	ER
N105	Ja	Ja	Ja	teilsensitiv	resistent	lysosomal
N122	Ja	Nein	n.a.*		k.A.	lysosomal
N206	Ja	Ja	Ja	wie WT, ER Bande jedoch stärker	sensitiv	lysosomal mit rER
N224	Ja	Ja	Potentiell	wie WT, ER Bande jedoch stärker	sensitiv	lysosomal
N249	Ja	Ja	Ja	wie WT, ER Bande jedoch stärker	sensitiv	lysosomal mit rER
N304	Ja	Ja	Ja	wie WT (in Hela teilsensitiv)	resistent	lysosomal mit rER
N325	Ja	Ja	Ja	wie WT, ER Bande jedoch sehr viel stärker	sensitiv	lysosomal mit rER
N412	Ja	Ja	Ja	wie WT	sensitiv	lysosomal
N430	Nein	Nein	Potentiell	wie WT	k.A.	lysosomal

* zum Abgleich wurden die Daten für die humane LIMP-2 Variante (Q14108; SCRB2_HUMAN) verwendet, in der diese N-Glykosylierungsstelle nicht konserviert ist.

4.1.5 Die nicht konservierte N-Glykosylierungsstelle N122 wird nicht genutzt

Wie unter Abschnitt 4.1.2.1 bemerkt, konnte für die im humanen LIMP-2 Protein nicht konservierte N-Glykosylierungsstelle N122 bei der Analyse der murinen LIMP-2-NQ Varianten in COS-7 Zellen keine Nutzung festgestellt werden. Auch nach Expression in murinen LIMP-2 defizienten embryonalen Fibroblasten konnte die fehlende Nutzung der N-Glykosylierungsstelle N122 gezeigt werden (siehe Abbildung 4.1-11), so dass ein zelltypspezifischer Effekt ausgeschlossen werden kann. Parallel dazu wurde die partielle EndoH Sensitivität des endogenen LIMP-2 Proteins und die Schlüsselrolle der N-Glykosylierungsstelle N68 in den murinen embryonalen Fibroblasten gezeigt. Somit wurden die vorhergehenden Ergebnisse bestätigt.

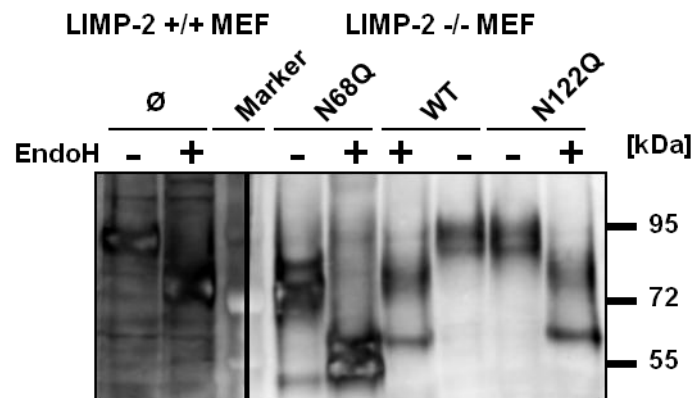


Abbildung 4.1-11: Western-Blot: EndoH Behandlung ausgewählter Einzelaustausch-Varianten von LIMP-2 in LIMP-2 defizienten MEF und endogen in Wildtyp MEF.

LIMP-2 Wildtyp (WT) und die LIMP-2 Variante mit der entnommenen N-Glykosylierungsstelle N122 (N122Q) weisen nach Expression in LIMP-2 defizienten murinen embryonalen Fibroblasten ein gleiches apparentes Molekulargewicht für das mature (-) als auch für das partiell deglykosylierte Protein (+) auf. Im Gegensatz dazu ist beim Austausch der Glykosylierungsstelle N68 das apparente Molekulargewicht in beiden Fällen erniedrigt. Bei den verwendeten Konstrukten handelt es sich um die murine LIMP-2 Sequenz mit einem C-terminalen Myc-Tag. Zusätzlich ist auch die partielle EndoH Sensitivität für das endogene murine LIMP-2 gezeigt (Ø).

In Bezug auf die Glykosylierungsstelle N122 stellte sich jedoch die Frage, ob es zu einer Nutzung dieser Stelle kommen würde, falls sie in die humane LIMP-2 Sequenz integriert werden würde und ob das Einfügen von N122 einen Einfluss auf das humane LIMP-2 Protein hätte. Dazu wurde die humane LIMP-2-D122N Variante generiert, die somit gegenüber dem humanen LIMP-2 Wildtyp Protein über eine zusätzliche potentielle N-Glykosylierungsstelle verfügte. Mittels Immunfluoreszenzstudien in COS-7 Zellen konnte kein Unterschied hinsichtlich der lysosomalen Lokalisation der Variante gegenüber der des Wildtyps beobachtet werden (siehe Abbildung 4.1-12). Durch den Aminosäureaustausch wurde demnach die Lokalisation nicht beeinflusst.

Ergebnisse

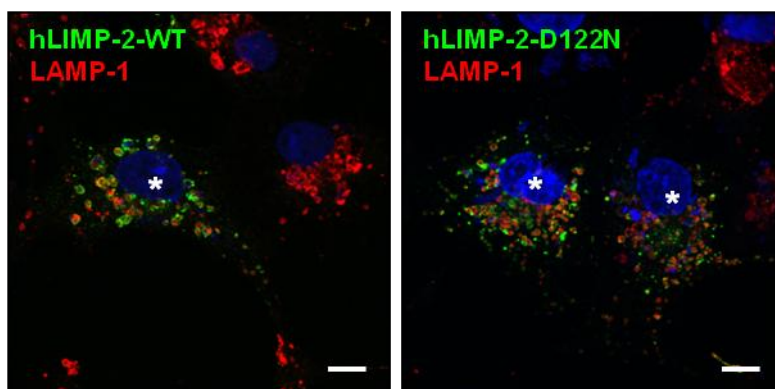


Abbildung 4.1-12: Lokalisation der humanen LIMP-2-D122N Variante in COS-7 Zellen.

Immunfluoreszenzbilder der Ko-Lokalisation von humanem LIMP-2 Wildtyp Protein (links) und der humanen LIMP-2 Variante D122N (rechts) mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1 (rot angefärbt) in COS-7 Zellen. Beide LIMP-2 Konstrukte sind C-terminal mit einem Myc-Tag versehen. Transfizierte Zellen sind durch einen weißen Stern markiert. Die eingesetzten primären und sekundären Antikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung sind in Abschnitt 3.1.11 tabelliert. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Analog zu 4.1.2.1 konnte durch den Vergleich des im *Western-Blot* detektierten apparenten Molekulargewichts von hLIMP-2-D122N und dem humanen LIMP-2 Wildtyp Protein kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 4.1-13). Der Eindruck einer möglichen verstärkten Expression der humanen LIMP-2-D122N Variante gegenüber dem Wildtyp Protein konnte in Wiederholungsexperimenten nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

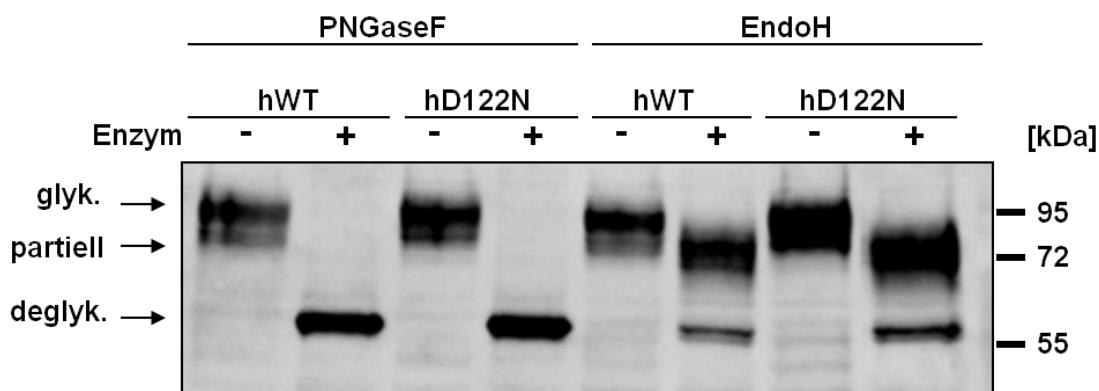


Abbildung 4.1-13: Western-Blot: PNGaseF und EndoH Behandlung der humanen LIMP-2-D122N Variante im Vergleich zum WT Protein in COS-7 Zellen.

Durch die Einführung der zusätzlichen potentiellen N-Glykosylierungsstelle N122 in das humane LIMP-2 Protein ergibt sich kein Unterschied des apparenten Molekulargewichts im Vergleich zum humanen Wildtyp Protein ((-) Banden miteinander verglichen). Auch das Verhalten gegenüber PNGaseF (-) und EndoH (+) ist bei beiden Proteinen gleich. Beide LIMP-2 Konstrukte sind C-terminal mit einem Myc-Tag versehen.

Die aus den durchgeführten Experimenten generierten Daten sprechen dafür, dass keine Glykosylierung der potentiellen N-Glykosylierungsstelle N122 erfolgt. Sowohl ihr Entfernen als auch ihr Einfügen in das LIMP-2 Protein hat keinen Einfluss auf das Protein. Anscheinend ist diese potentielle N-Glykosylierungsstelle der Glykosylierungsmaschinerie strukturell nicht zugänglich, was eventuell auf der Faltungstopologie von LIMP-2 basiert.

4.1.6 Auswirkungen der AMRF hervorrufoenden Punktmutation H363N

Die Analyse (Blanz et al., 2010) der AMRF hervorrufoenden Mutation H363N (Dardis et al., 2009) zeigte deutlich, dass eine korrekte Glykosylierung für das LIMP-2 Protein bedeutend ist. So wird durch die Punktmutation c.1087C.A im SCARB2 Gen der Austausch des hochkonservierten Histidins H363 in ein Asparagin [N] im humanen LIMP-2 Protein hervorgerufen. Durch das Asparagin in Position 363 ergibt sich eine zusätzliche potentielle N-Glykosylierungsstelle innerhalb des LIMP-2 Proteins. In Immunfluoreszenzstudien konnte hier, im Gegensatz zur hLIMP-2-D122N Variante, gezeigt werden, dass diese Punktmutation zur Fehllokalisierung des Proteins im rER führt (Blanz et al., 2010; Abbildung 4.1-14).

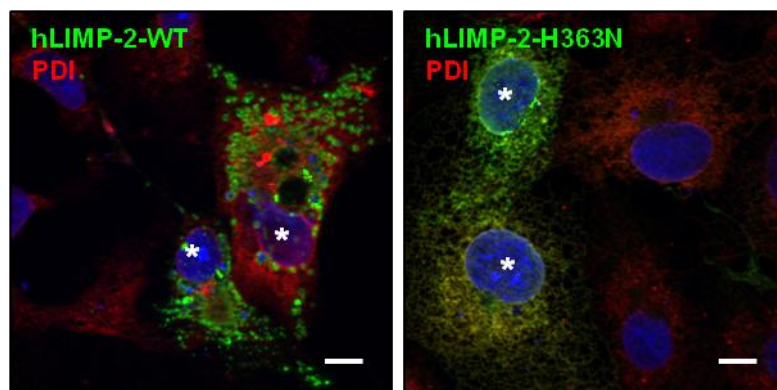


Abbildung 4.1-14: Lokalisation der humanen LIMP-2-H363N Variante in COS-7 Zellen.

Während das LIMP-2 Wildtyp Protein (links) vesikulär lysosomal lokalisiert ist, zeigt die LIMP-2 Variante H363N (rechts) Ko-Lokalisation mit dem ER Markerprotein PDI. Beide LIMP-2 Konstrukte sind C-terminal mit einem Myc-Tag versehen. Transfigurierte Zellen sind durch einen weißen Stern markiert. Die eingesetzten primären und sekundären Antikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung sind in Abschnitt 3.1.11 tabelliert. Maßstabsbalken: 10 µm. Abbildung modifiziert nach Blanz et al., 2010.

Die Fehllokalisierung konnte durch die vollständige EndoH Sensitivität der LIMP-2 Variante im *Western-Blot* bestätigt werden (Abbildung 4.1-15 A). Diese Mutante verblieb im rER und somit blieb die vollständige Maturierung des Proteins aus. Dadurch konnte auch keine Aussage hinsichtlich der potentiellen Nutzung der zusätzlichen N-Glykosylierungsstelle getroffen werden. Daher wurde die H363N Punktmutation in die murine LIMP-2 Variante 11xNA eingefügt, die an sich keine Glykosylierungsstelle enthält. Mit diesem Ansatz konnte analog zu 4.1.1.1 gezeigt werden, dass am Asparagin N363 prinzipiell eine Glykosylierung stattfinden kann. So trat eine zweite Bande oberhalb der des glykosylierungsfreien Polypeptidkerns in den unbehandelten (-) Ansätzen auf, die in den mit PNGaseF und EndoH behandelten Ansätzen (+) nicht existent war (siehe schwarze Sterne in Abbildung 4.1-15). Offen blieb allerdings, ob die zusätzliche Glykosylierung oder aber der Austausch des hochkonservierten Histidins an sich, die rER Retention der LIMP-2 Variante durch z.B. Fehlfaltung hervorrief.

Ergebnisse

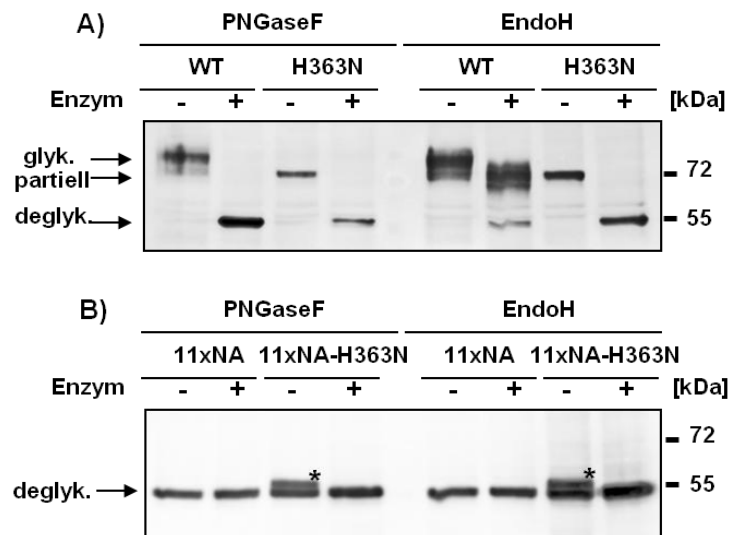


Abbildung 4.1-15: Western-Blots: Analyse der LIMP-2-H363N Punktmutation mittels PNGaseF und EndoH Behandlung.

(A) Während humanes LIMP-2 Wildtyp Protein eine partielle EndoH Sensitivität aufweist, ist die H363N Variante des Proteins vollständig sensitiv gegenüber EndoH (+), erkennbar durch das Fehlen der Bande für das partiell deglykosylierte Protein. Im Wildtyp Ansatz ist diese Bande deutlich zu erkennen.

(B) Durch die Punktmutation H363N wird in der murinen nicht glykosylierfähigen LIMP-2 Variante 11xNA eine Glykosylierungsstelle eingefügt, die auch genutzt wird (siehe schwarze Sterne).

Alle LIMP-2 Konstrukte sind C-terminal mit einem Myc-Tag versehen. (+) steht für den Ansatz mit vorheriger Enzymbehandlung, die parallel mitgeführten Kontrollansätze sind mit (-) gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Blanz *et al.*, 2010.

4.1.7 Die partielle EndoH Sensitivität von LIMP-2 beruht nicht auf der Interaktion zwischen LIMP-2 und β -GC

Um zu klären, ob die u.a. in COS-7 Zellen (siehe Abbildung 4.1-8), murinen embryonalen Fibroblasten (siehe Abbildung 4.1-11) sowie in Hela Zellen (Daten nicht gezeigt) zu beobachtende partielle EndoH Sensitivität des endogenen LIMP-2 Proteins eventuell auf die im rER stattfindende Bindung der β -GC zurückzuführen ist (Abbildung 4.1-16), sollte mittels siRNA die Expression von β -GC in Hela Zellen verhindert werden (Methodenteil 3.2.2.6). In den nun β -GC „freien“ Zellen sollte das Verhalten von endogenem LIMP-2 gegenüber einer Deglykosylierung mit EndoH untersucht werden. Falls β -GC tatsächlich für die partielle EndoH Sensitivität durch die Maskierung der entsprechenden N-Glykosylierungsstellen verantwortlich ist, sollte das endogene lysosomale LIMP-2 Protein in Abwesenheit der β -GC nicht durch EndoH deglykosylierbar sein. Da der siRNA β -GC *Knockdown* jedoch nicht effizient genug war (Daten nicht gezeigt), wurde das Verhalten des endogenen LIMP-2 Proteins aus β -GC defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (β -GC $-/-$ MEFs) gegenüber EndoH untersucht.

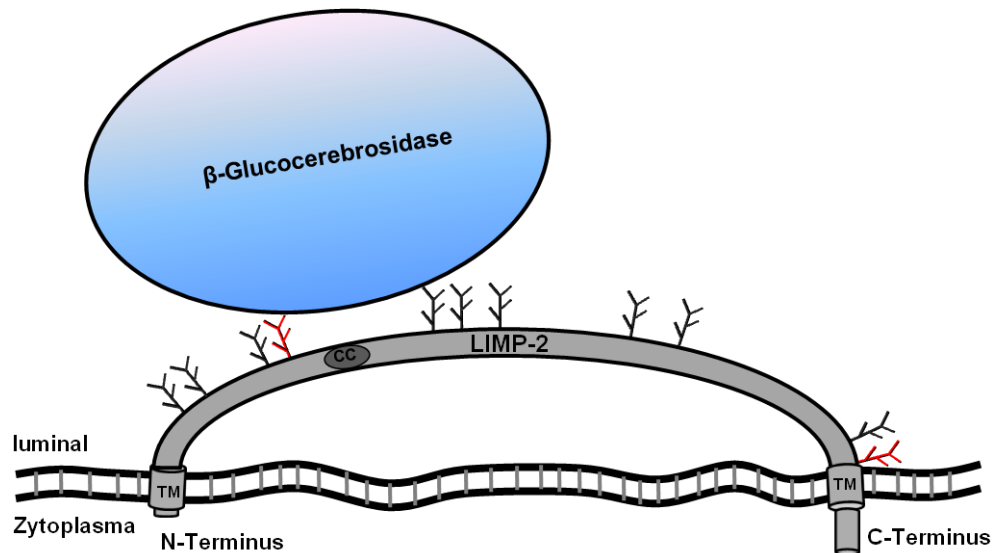


Abbildung 4.1-16: Schematische Darstellung der Maskierung von N-Glykosylierungsstellen durch die Interaktion von LIMP-2 mit β -GC.

Durch die Interaktion mit der β -Glucocerebrosidase im rER könnte es zur Maskierung initial glykosylierter N-Glykosylierungsstellen kommen. Deren Reifung im Golgi-Apparat würde dann nicht mehr erfolgen und sie würden auch im maturen Protein in einem EndoH sensitiven Status verbleiben. Die zuvor als nicht genutzt identifizierten N-Glykosylierungsstellen des murinen LIMP-2 Proteins sind in rot eingefärbt.

Die Analyse von β -GC defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (β -GC KO-MEF) zeigte keinerlei Unterschied hinsichtlich einer partiellen EndoH Sensitivität des endogenen LIMP-2 Proteins (Abbildung 4.1-17). Somit konnte eine Kausalität zwischen β -GC Interaktion bzw. Bindung und der zu beobachtenden partiellen EndoH Sensitivität weitestgehend ausgeschlossen werden.

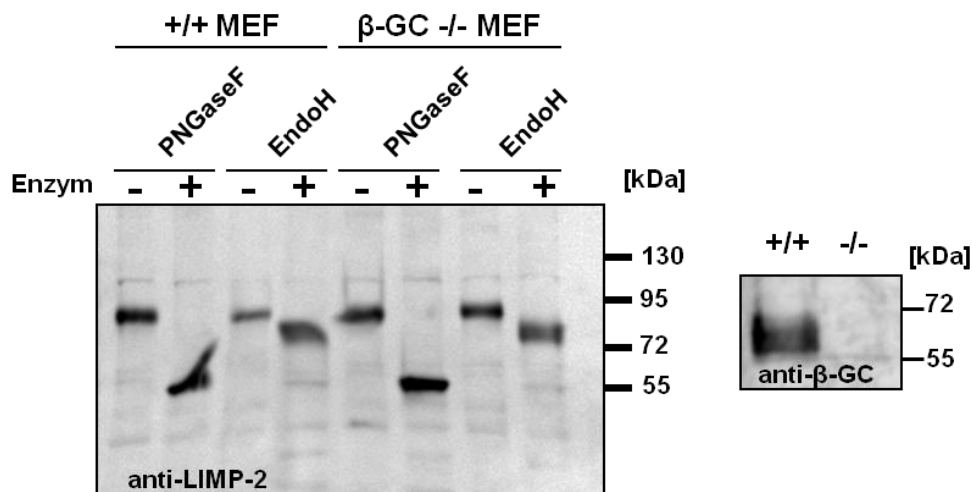


Abbildung 4.1-17: Western-Blots: Deglykosylierung von endogenem LIMP-2 durch PNGaseF und EndoH in Wildtyp und β -GC defizienten murinen embryonalen Fibroblasten.

Sowohl in Wildtyp als auch in β -GC defizienten MEFs tritt das gleiche Bandenmuster nach PNGaseF und EndoH Behandlung mit einer partiellen EndoH Sensitivität von LIMP-2 auf. Ansätze mit vorheriger Enzymbehandlung sind mit einem (+) gekennzeichnet. Der rechts nebenstehende Blotausschnitt belegt die β -GC Defizienz der β -GC defizienten MEFs.

Ergebnisse

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die Analyse der Glykosylierungsvarianten von LIMP-2 die Nutzung potentieller N-Glykosylierungsstellen geklärt werden konnte. Die Bedeutung einzelner N-Glykosylierungsstellen wurde dabei aufgezeigt. In Hinblick auf das LIMP-2 Modell ist jedoch zu beachten, dass die für die Strukturintegrität von LIMP-2 anscheinend notwendige N-Glykosylierungsstelle N68 nicht im Modell eingeschlossen ist. Weiterhin kann das Modell die Nichtnutzung der N-Glykosylierungsstelle N122 nicht erklären. Laut Strukturmodell (siehe Abbildung 4.1-1) liegt das Asparagin N122 gut zugänglich in einem Schleifenbereich des Proteins. Aus diesen Gründen ist das LIMP-2 Strukturmodell zu überdenken.

4.2 Untersuchungen einer möglichen Dimerisierung von LIMP-2

Neben der Untersuchung des Glykosylierungsstatus und des Einflusses der Glykosylierung auf LIMP-2 war die Aufklärung einer potentiellen LIMP-2 Dimerisierung eine weitere Fragestellung der vorliegenden Dissertation.

So fiel bei der *Western-Blot* Analyse der Überexpression von LIMP-2 u.a. in COS-7 Zellen eine SDS-resistente Bande im Molekulargewichtsbereich eines potentiellen LIMP-2 Dimers auf (siehe Abbildung 4.2-1). Zusammen mit der in der Literatur beschriebenen Dimerbildung von CD36 (Thorne et al., 1997) und CLA1/ SCARB1 (SR-BI) (Reaven et al., 2004; Sahoo et al., 2007 (a und b)) lag daher die Vermutung nahe, dass eine ebensolche Dimerbildung für LIMP-2 auch möglich wäre.

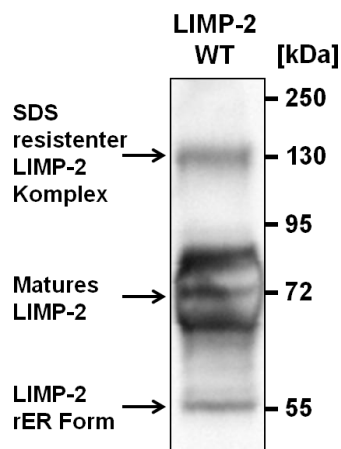


Abbildung 4.2-1: Verschiedene Signale im *Western-Blot* nach Überexpression von LIMP-2 Wildtyp in COS-7 Zellen.

Nach Überexpression von LIMP-2 in COS-7 zeigen sich im *Western-Blot* der unter reduzierenden Bedingungen durchgeführten denaturierenden SDS-PAGE drei verschiedene Signale für das LIMP-2 Protein. Die Lage der verschiedenen LIMP-2 Spezies ist an der linken Seite des *Blots* markiert. Die rER Form entspricht der deglykosylierten Form von LIMP-2.

Da *coiled-coil* Motive weitverbreitete Dimerisierungsdomänen sind (Lupas, 1996), wurde eine Beteiligung des innerhalb der luminalen LIMP-2 Domäne gelegenen *coiled-coil* Motivs an der Dimerausbildung zuerst untersucht. Es konnte aber im *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-System* durch entsprechende LIMP-2 Varianten ohne *coiled-coil* Motiv gezeigt werden, dass eine homologe Interaktion von LIMP-2 unabhängig von diesem *coiled-coil* Motiv stattfindet (Groth, 2007). Darüber hinaus war es bisher auch nicht möglich eine solche homologe LIMP-2 Dimerausbildung z.B. mittels Ko-Präzipitation zu verifizieren (Groth, 2007).

4.2.1 LIMP-2 Dimerbildung durch *Crosslink* mit Photo-Aminosäuren

Daher wurde der auf der Diazirin-Photo-Reaktivität basierende *Crosslink* mit L-Photo-Leucin und L-Photo-Methionin etabliert (Suchanek et al., 2005). Durch diese Art von *Crosslink* ist eine endogene Verknüpfung der zu untersuchenden Proteine *in vivo* im Zellkultursystem möglich. Die jeweiligen Interaktionspartner müssen sich jedoch aufgrund der Kettenlänge des Vernetzers von nur etwa einer Atombindung in unmittelbarer Nähe zu einander befinden. Zum Mechanismus und zur Methodik siehe Abschnitt 3.2.3.13. Um einen „Größenstandard“ für die erfolgreiche Dimerbildung zu besitzen, wurde eine LIMP-2 Mutante generiert, die aus zwei LIMP-2 Molekülen bestand. Die beiden Moleküle waren dabei über den C-Terminus des ersten LIMP-2 Moleküls mit dem N-Terminus des nachfolgenden zweiten LIMP-2 Moleküls verbunden. Nach Expression war diese „Tandemmutante“ jedoch nicht lysosomal lokalisiert, sondern konnte nur im rER detektiert werden. Zwar erfolgte eine Glykosylierung dieser Mutante (Daten nicht gezeigt) doch anscheinend war der Weitertransport aus dem rER in den Golgi-Apparat bei dieser LIMP-2 Mutante gestört. Als Größenstandard für das apparente Molekulargewicht eines eventuellen LIMP-2 Dimers in der SDS-PAGE bzw. im *Western-Blot* konnte sie trotzdem verwendet werden.

Mit Hilfe des Photo-Aminosäuren Assays konnte eine LIMP-2 Dimerbildung sowohl endogen als auch im verstärkten Maße nach Überexpression eines LIMP-2 Wildtyp Konstrukts nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.2-2).

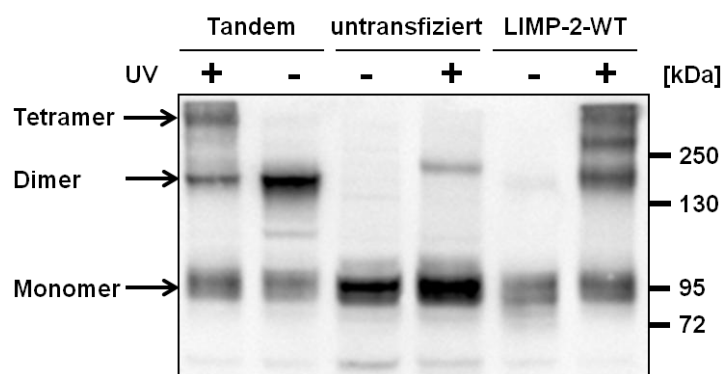


Abbildung 4.2-2: Western-Blot: LIMP-2 im Photo-Aminosäuren Assay endogen und nach Überexpression in COS-7 Zellen.

LIMP-2 kann sowohl in Überexpression (LIMP-2-WT) als auch auf endogener Ebene (untransfiziert) in COS-7 Zellen mittels Photo-reaktiver Aminosäuren (+) in eine dimere Konformation überführt werden. Da die Detektion mit einem LIMP-2 Antikörper durchgeführt wurde, der das endogene LIMP-2 Protein erkennt, wird dieses auch in den Ansätzen der LIMP-2 Tandemmutante nachgewiesen. Die Tandemmutante dient als Größenmaßstab für das apparente Molekulargewicht eines LIMP-2 Dimers. Mit (+) und ohne (-) UV-Bestrahlung der in Photo-Aminosäuren Medium kultivierten Zellen. Die Lage der jeweiligen Monomere und Dimere ist an der linken Seite des *Blots* markiert.

Ergebnisse

Um eine zelltypabhängige Spezifität bei der homologen LIMP-2 Verknüpfung über die Photo-Aminosäuren ausschließen zu können, wurde dieses Experiment in murinen Wildtyp (+/+) Fibroblasten wiederholt. Auch in diesem Zelltyp gelang die homologe Verknüpfung des endogenen LIMP-2 Proteins über Photo-Aminosäuren (Abbildung 4.2-3 oben). Neben den als Kontroll-Zelllinie mitgeführten LIMP-2 defizienten Fibroblasten (LIMP-2 $-/-$) wurden β -GC defizienten embryonalen Fibroblasten (β -GC $-/-$) ebenfalls untersucht. Dabei konnte im β -GC $-/-$ Ansatz nach UV-Bestrahlung (+) dieselbe Bande wie im +/+ Ansatz im LIMP-2 *Western-Blot* detektiert werden (Abbildung 4.2-3 oben, weiße Sterne). Daher durfte davon ausgegangen werden, dass β -GC keinen Einfluss auf die homologe LIMP-2 Verknüpfung mittels Photo-Aminosäuren hat.

Während für das endogene LIMP-2 Protein eine homologe Verknüpfung beobachtet werden konnte, zeigte endogene β -GC nahezu keine Homo-Dimerbildung (Abbildung 4.2-3 unten).

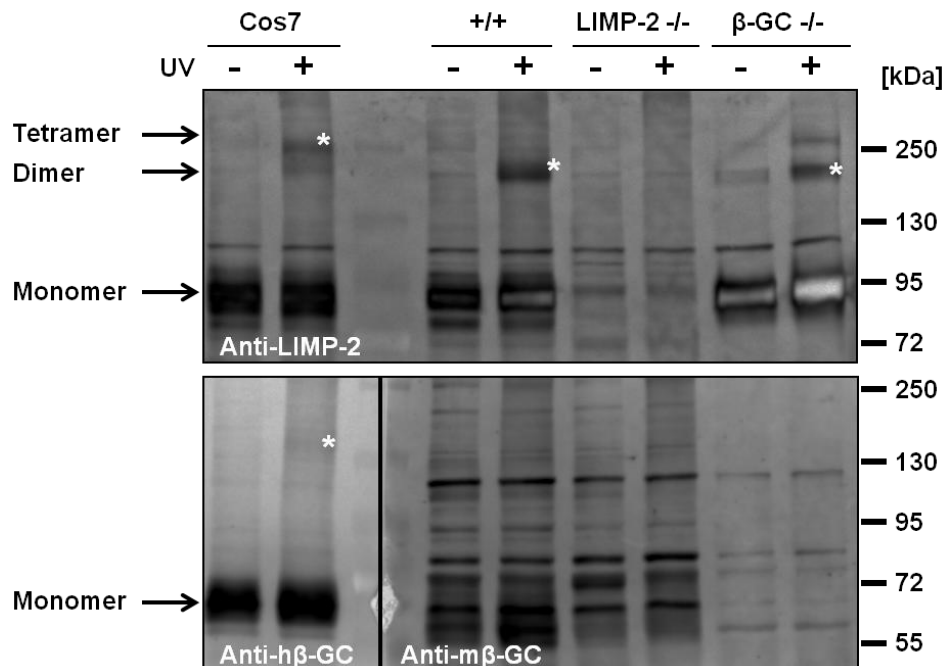


Abbildung 4.2-3: Western-Blots: Endogene Dimerisierung von LIMP-2 und β -GC mittels Photo-Aminosäuren in verschiedenen Zelllinien.

(Oben) Auch in murinen embryonalen Fibroblasten erfolgt einer Dimerisierung (weißer Stern) von endogenem LIMP-2 mittels Photo-reaktiver Aminosäuren (+). Diese ist auch unabhängig von β -GC, wie sich anhand von β -GC defizienten Fibroblasten zeigte, in deren Ansatz nach UV-Bestrahlung sich ebenfalls eine Bande mit dem apparenten Molekulargewicht eines LIMP-2 Dimers detektieren ließ.

(Unten) Es konnte nahezu keine Dimersierung von β -GC auf endogener Ebene beobachtet werden. Nur äußerst schwach ist in den zur Kontrolle mitgeführten COS-7 Zellen eine mögliche Dimerbande zu erkennen (weißer Stern).

Mit (+) und ohne (-) UV-Bestrahlung der in Photo-Aminosäuren Medium kultivierten Zellen. Die Lage der jeweiligen Monomere und Dimere ist an der linken Seite des jeweiligen Blots markiert.

4.2.2 Ein LIMP-2 / β -GC Komplex lässt sich nicht über Photo-Aminosäuren stabilisieren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch die Verknüpfung über die Photo-Aminosäuren ein LIMP-2 Homodimer stabilisiert wurde, sollte im Weiteren geprüft werden, ob eine Verknüpfung von LIMP-2 mit seinem Interaktionspartner β -GC in Form eines Heterodimers mit dieser Methode möglich wäre. Die Daten aus dem endogenen Versuchsansatz (4.2.1) sprachen zwar dagegen, da zum einen β -GC auch nach UV-Bestrahlung der Zellen nur als Monomer im *Western-Blot* detektiert werden konnte und zum anderen in den β -GC $-/-$ Ansätzen dieselbe LIMP-2 „Dimerbande“ auftrat wie in den Wildtyp Fibroblasten (Abbildung 4.2-3). Dabei ist jedoch zu beachten, dass unter *steady state* Bedingungen nahezu 95 % der endogenen LIMP-2 und β -GC Moleküle lysosomal lokalisiert sind und dort eine Trennung von LIMP-2 und β -GC aufgrund des erniedrigten pH-Wertes postuliert wird (Reczek et al., 2007). Doch auch die Überexpression von β -GC zusammen mit LIMP-2 führte nach UV-Bestrahlung der Ansätze zu keiner detektierbaren Heterodimerbande (siehe Abbildung 4.2-4). Im Gegensatz zur endogenen Situation (vgl. Abbildung 4.2-3) konnte nun die Ausbildung eines β -GC Homodimers bzw. höher molekularer Komplexe gezeigt werden (siehe Abbildung 4.2-4). Ob es sich bei den *Western-Blot* Banden mit höherem apparenten Molekulargewicht ab 200 kDa um Hetero-Komplexe aus LIMP-2 und β -GC handelt konnte aufgrund der niedrigen Auflösung des denaturierenden SDS-PAGE Gels nicht zweifelsfrei geklärt werden.

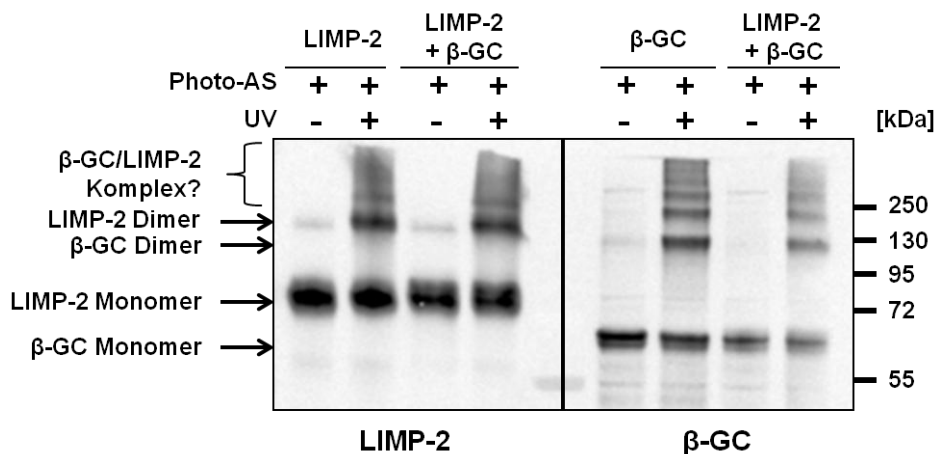


Abbildung 4.2-4: Western-Blot: Dimerisierung/Oligomerisierung mittels Photo-Aminosäuren von überexprimiertem LIMP-2 und β -GC in COS-7 Zellen.

LIMP-2 und β -GC wurden entweder alleine oder zusammen (LIMP-2 + β -GC) in COS-7 Zellen überexprimiert. Die linke Hälfte des *Blots* wurde gegen LIMP-2, die rechte gegen β -GC gefärbt. Es konnten jeweils Homodimere von LIMP-2 und β -GC detektiert werden, jedoch kein Heterodimer. Eine gesicherte Aussage über die Zusammensetzung der höhermolekularen Komplexe ist aufgrund der niedrigen Auflösung des verwendeten SDS-PAGE Gels nicht möglich. Mit (+) und ohne (-) UV-Bestrahlung der in Photo-Aminosäuren Medium kultivierten Zellen. Die Lage der jeweiligen Monomere und Dimer ist an der linken Seite des *Blots* markiert.

4.2.3 Eine Eingrenzung der Dimerisierungsdomäne von LIMP-2 ist über den Photo-Aminosäuren Ansatz nicht möglich

In einem nächsten Schritt sollte die Dimerisierungsdomäne von LIMP-2 identifiziert werden. Dabei ergaben die Untersuchungen, dass die LIMP-2 Dimerbildung unabhängig vom Glykosylierungsstatus des Proteins schon innerhalb des rER vollzogen werden konnte. So zeigte sowohl die nicht glykosylierfähige LIMP-2-11xNA Variante also auch eine LIMP-2-ER-Retentionsmutante (Reczek et al., 2007) im Photo-Aminosäuren Assay eine LIMP-2 Oligomerisierung (Abbildung 4.2-5 A).

Darüberhinaus ist die für die Interaktion mit der β -GC notwendige *coiled-coil* Struktur an der Ausbildung eines LIMP-2 Dimers nicht beteiligt. Dies zeigte sich anhand der *coiled-coil* Deletionsmutante und der LIMP-2-L160P Variante, die aufgrund des Austausches des Leucins gegen ein Prolin keine α -helikale Struktur im Bereich des *coiled-coils* aufwies (Abbildung 4.2-5 B). Damit konnten die aus dem *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-System* gewonnenen Daten (Groth, 2007) bestätigt werden.

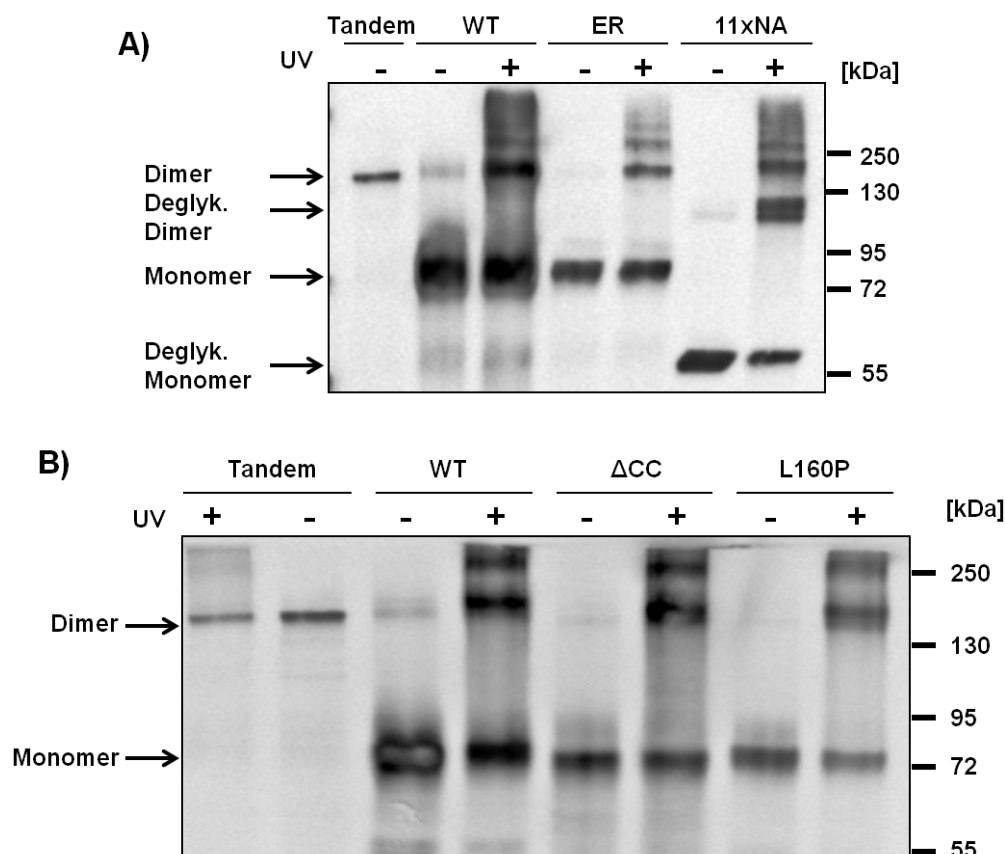


Abbildung 4.2-5: Western-Blots: Dimerausbildung verschiedener LIMP-2 Varianten nach Photo-Aminosäuren Behandlung in COS-7 Zellen.

(A) Eine Homo-Dimerausbildung von LIMP-2 mittels Photo-Aminosäuren findet schon im rER und unabhängig vom Glykosylierungsstatus des Proteins statt, wie sich aus der Analyse einer LIMP-2 Variante mit einer KDEL-Sequenz (ER), die zur rER Lokalisation der LIMP-2 Variante führte, und der nicht glykosylierfähigen LIMP-2 Variante (11xNA) ergab. Für beide Varianten sind nach UV-Bestrahlung (+) höhermolekulare Banden mit einem

entsprechenden Homodimer im *Western-Blot* zu detektieren. Das Wildtyp LIMP-2 Konstrukt (WT) und die Tandemvariante sind als Kontrollen mitgeführt.

(B) Auch die *coiled-coil* Domäne hat keinen Einfluss auf die Ausbildung eines LIMP-2 Homodimers. So zeigen die Varianten ohne die *coiled-coil* Domäne (Δ CC) und mit zerstörter α -helikaler Struktur des *coiled-coil* Bereiches (L160P) dieselben Bandenmuster wie das zur Kontrolle mitgeführte LIMP-2 Wildtyp Protein (WT). Die LIMP-2 Tandemmutante (Tandem) wurde auch hier als Kontrolle mitgeführt.

Die Lage des LIMP-2 Monomers und des entsprechenden Homodimers ist an der linken Seite des *Blots* markiert. Mit (+) und ohne (-) UV-Bestrahlung der in Photo-Aminosäuren Medium kultivierten Zellen.

Da für die Verknüpfung mittels Photo-reaktiver Aminosäuren neben Photo-Leucin auch Photo-Methionin verwendet wurde und da insgesamt nur zehn Methionine in der luminalen LIMP-2 Domäne enthalten sind, sollte über einen Methionin-Screen und alleiniger Verwendung von L-Photo-Methionin für die Verknüpfung die Dimerisierungsdomäne von LIMP-2 eingegrenzt werden. Dazu wurden, basierend auf einer bis auf das Startmethionin methioninfreien LIMP-2 Mutante, LIMP-2 Varianten mit jeweils einem re-inserierten luminalen Methionin generiert. Nach Expression dieser LIMP-2 Varianten im Zellkultursystem wurde der Photo-Aminosäuren Assay bei alleiniger Verwendung von L-Photo-Methionin durchgeführt. Eine Eingrenzung der Interaktionsdomäne mittels des Methionin-Screens schlug jedoch fehl. So konnte nach Re-inserierung eines jeden einzelnen der zehn luminalen Methionine eine Dimerbildung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), so dass auf diese Weise kein einzelnes für die Dimerbildung verantwortliches Methionin identifiziert werden konnte. Da jede der LIMP-2 Methionin Varianten im rER fehllokalisiert war (Daten nicht gezeigt), liegt hier anscheinend eine Fehlfaltung des jeweiligen LIMP-2 Proteins vor, die dann zur artifiziellen Dimerausbildung führt.

4.2.4 Das Bandenmuster im *Western-Blot* nach *Crosslink* über Photo-Aminosäuren und unter nicht reduzierenden Bedingungen ist für LIMP-2 identisch

In Vorversuchen wurde beobachtet, dass sich im *Western-Blot* einer unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführten denaturierenden SDS-PAGE höhermolekulare Bandensignale für überexprimiertes LIMP-2 detektieren ließen (Daten nicht gezeigt). Unter nicht reduzierenden Bedingungen bleiben im Allgemeinen Disulfidbrücken erhalten, so dass Proteine die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, als ein Proteinkomplex detektiert werden können.

Es sollte nun überprüft werden, ob die unter nicht reduzierenden Bedingungen auftretenden Signale, dieselben waren, wie die, die nach dem *Crosslink* mit den Photo-Aminosäuren zu detektieren waren. Des Weiteren sollte durch die parallele β -GC Detektion eruiert werden, ob die β -GC in diesen unter nicht reduzierenden Bedingungen auftretenden Proteinkomplexen

Ergebnisse

mit enthalten ist und somit eine eventuelle Disulfidverbrückung von LIMP-2 und β -GC besteht.

Dazu wurde eine denaturierende SDS-PAGE durchgeführt, bei der die Probenvorbereitung sowohl unter reduzierenden Bedingungen (+ DTT) als auch ohne Zugabe von DTT erfolgte (-DTT). Anschließend wurden diese Proben zusammen mit Proben aus dem Photo-Aminosäuren Assay aufgetragen. Im *Western-Blot* konnte gezeigt werden, dass das entstandene Bandenmuster durch das Weglassen des Reduktionsmittel DTT dem nach dem *Crosslink* mit Photo-Aminosäuren entsprach (siehe Abbildung 4.2-6). Eine Beteiligung der β -GC an den Banden mit höherem apparenten Molekulargewicht konnte durch die Detektion der endogenen β -GC als Monomerbande sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 4.2-6).

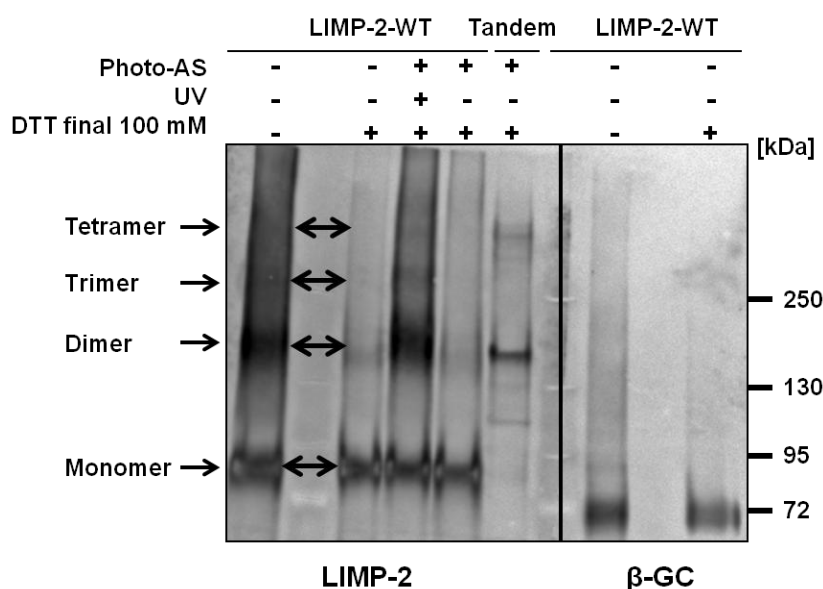


Abbildung 4.2-6: Vergleich der auftretenden Bandenmuster im *Western-Blot* nach der Vernetzung über Photo-Aminosäuren und Probenlauf unter nicht reduzierenden Bedingungen.

(Links) Bei Detektion von LIMP-2 ist das auftretende Bandenmuster unter nicht reduzierenden Bedingung (- Photo-AS/UV/DTT) identisch mit dem nach *Crosslink* über die Photo-Aminosäuren (+ Photo-AS/UV/DTT). LIMP-2 Wildtyp Protein (LIMP-2-WT) wurde in COS-7 Zellen entweder mit (+ Photo-AS) oder ohne Photo-Aminosäuren (- Photo-AS) überexprimiert. Die Zellen wurden anschließend entweder UV-bestrahtet (+ UV) oder nicht (- UV). Die Analyse der Ansätze erfolgte danach unter reduzierenden (+DTT) oder nicht reduzierenden Bedingungen (- DTT). Die LIMP-2 Tandemmutante wurde als Kontrolle mitgeführt. Die Lage des LIMP-2 Monomers und der entsprechenden Multimere ist an der linken Seite des *Blots* markiert.

(Rechts) Kein Unterschied ist für β -GC zwischen reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen auf endogenem Level feststellbar.

Die Ergebnisse legen es also nahe, dass LIMP-2 nach Überexpression unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Homo-Dimer-/Komplexbildung über Disulfidbrücken eingehen kann. Dieselben Komplexe können unter reduzierenden Bedingungen durch den Photo-*Crosslink* stabilisiert werden.

4.2.5 Untersuchungen des Einflusses luminaler Cysteine hinsichtlich einer LIMP-2 Dimerisierung

Innerhalb der luminalen Domäne des murinen LIMP-2 Proteins sind fünf Cysteine lokalisiert, die unter der Annahme, dass eine Ausbildung von Disulfidbrücken im Zytosol ausgeschlossen werden kann, für die unter nicht reduzierenden Bedingungen beobachtete Disulfidverbrückung in Frage kämen.

Ähnlich dem Methionin-Screen (4.2.3) wurde auf Basis der Cysteine ebenso ein Versuch einer Eingrenzung der Dimerisierungsdomäne unternommen. Es wurden daher LIMP-2 Varianten generiert, in denen je eines der luminalen Cysteine gegen ein Alanin bzw. Serin ausgetauscht war. Wäre eines der luminalen Cysteine für die zu beobachtende Disulfidverbrückung verantwortlich, dürfte die LIMP-2 Variante, in der dieses Cystein ausgetauscht ist, unter nicht reduzierenden Bedingungen keine Signale oberhalb der LIMP-2 Monomerbande im *Western-Blot* zeigen. Die lysosomale Lokalisation der LIMP-2 Cystein Varianten wurde nur marginal gestört bzw. reduziert, so dass ein negativer Effekt auf die Proteinstruktur durch den Aminosäureaustausch scheinbar nicht gegeben war (Abbildung 4.2-7).

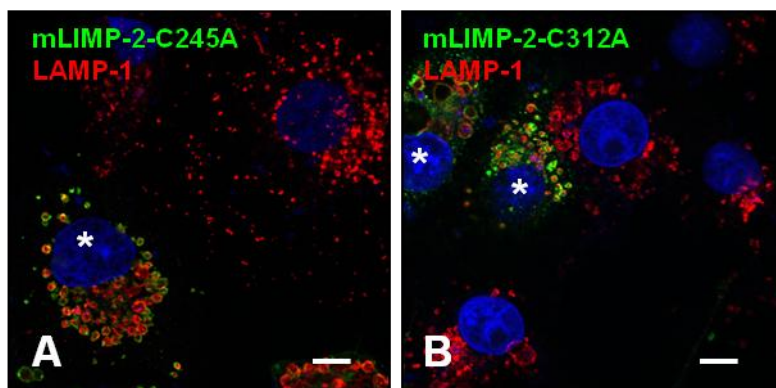


Abbildung 4.2-7: Lokalisation ausgewählter LIMP-2 Cystein Varianten in COS-7 Zellen.

Repräsentativ für die untersuchten LIMP-2 Cystein Varianten sind LIMP-2-C245A (A) und LIMP-2-C312A (B) dargestellt. Alle Einzel-Cystein Austausch Varianten von LIMP-2 sind lysosomal lokalisiert.

Ko-Lokalisation mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1 (roter Kanal).

Beide LIMP-2 Konstrukte sind C terminal mit einem Myc-Tag versehen. Transfizierte Zellen sind durch einen weißen Stern markiert. Die eingesetzten primären und sekundären Antikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung sind in Abschnitt 3.1.11 tabelliert. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Hinsichtlich des Auftretens der höher molekularen Banden unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte jedoch keine Änderung gegenüber dem LIMP-2 Wildtyp Protein festgestellt werden. In Abbildung 4.2-8 ist dies exemplarisch für drei der fünf Cysteinvarianten dargestellt.

Ergebnisse

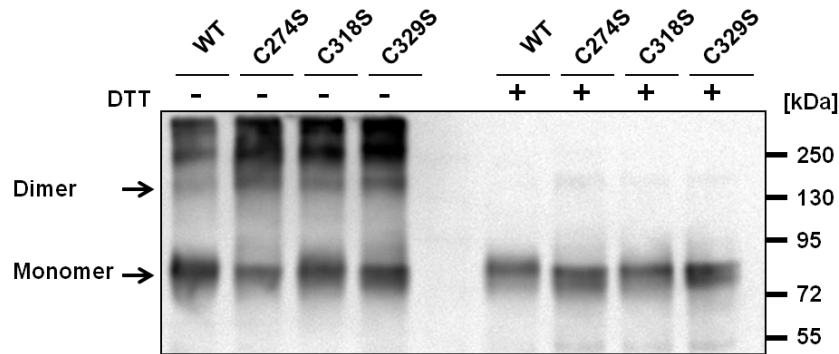


Abbildung 4.2-8: Vergleich der im Western-Blot auftretenden Banden unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen repräsentativer LIMP-2 Cystein Varianten.

In COS-7 Zellen überexprimierte LIMP-2 Varianten mit jeweils einem gegen ein Serin ausgetauschtem Cystein zeigen weiterhin ein dem Wildtyp Protein entsprechendes Bandenmuster unter nicht reduzierenden Bedingungen (- DTT). Die Lage des LIMP-2 Monomers und eines entsprechenden Dimers ist an der linken Seite des *Blots* markiert.

Darüber hinaus wies eine LIMP-2 Variante bei der alle fünf luminalen Cysteine ausgetauscht waren unter nicht reduzierenden Bedingungen ein dem Wildtyp Protein vergleichbares Bandenmuster auf (siehe Abbildung 4.2-9 links). Scheinbar haben die drei zytoplasmatischen Cysteine, die weiterhin in der LIMP-2 Variante enthalten waren, doch einen Einfluss auf die Disulfidverbrückung. Diese Verbrückung ist scheinbar dabei auch eher ein Artefakt der Überexpression, da sie auf endogener Ebene nicht bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 4.2-9 rechts).

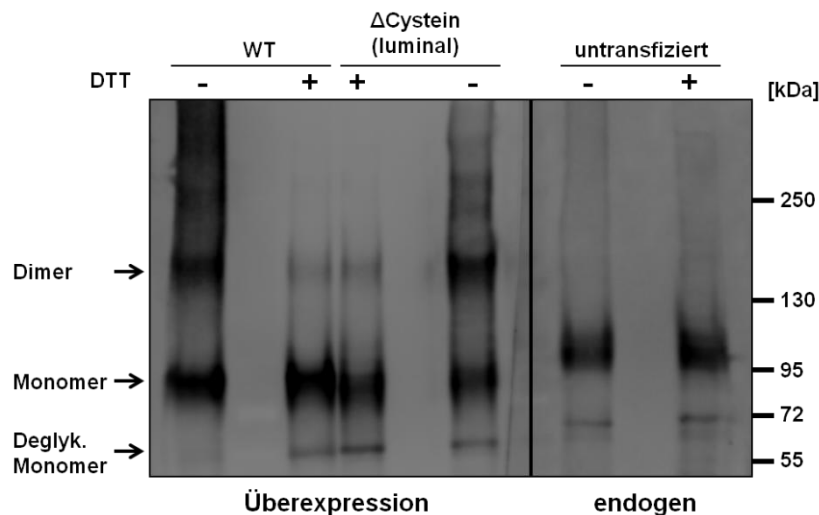


Abbildung 4.2-9: Vergleich der im Western-Blot auftretenden Banden unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen einer LIMP-2 Variante ohne luminal Cysteine nach Überexpression in COS-7 Zellen, sowie des endogenen LIMP-2 Proteins.

(Links) Eine in COS-7 Zellen überexprimierte LIMP-2 Variante, der alle fünf luminalen Cysteine fehlen (Δ Cystein), zeigte weiterhin unter nicht reduzierenden Bedingungen (- DTT) dasselbe Bandenmuster wie das ebenfalls überexprimierte LIMP-2 Wildtyp Protein (WT). Dies lässt den Schluß zu, dass die beobachtete Oligomerisierung unter nicht reduzierenden Bedingungen artifizierlicher Natur sein könnte und auf eine mögliche Disulfidbrückenbildung der drei cytoplasmatischen Cysteine zurückzuführen ist.

(Rechts) Für das endogene LIMP-2 Protein kann eine solche auf intermolekularen Disulfidbrücken beruhende Dimer- bzw. Oligomerbildung nicht gezeigt werden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen sind keine zusätzlichen höhermolekularen Banden detektierbar.

Die Lage des LIMP-2 Monomers, eines entsprechenden Dimers und der zusätzlich zu erkennenden deglykosylierten rER Form ist an der linken Seite des *Blots* markiert.

4.2.6 Intrazellulärer *Crosslink* von LIMP-2 und β -GC durch DSS in murinen embryonalen Fibroblasten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Stöchiometrie eines möglichen LIMP-2 / β -GC Komplex zu klären. Daher wurde nach Möglichkeiten gesucht diesen Komplex zu stabilisieren. Nachdem der intrazelluläre *Crosslink* von LIMP-2 und β -GC über die Photo-Aminosäuren eventuell aufgrund eines zu kleinen Reaktionsradius der L-Photo-Aminosäuren nicht erfolgreich war (4.2.2), wurde der *Crosslink*-Versuch mit dem chemischen *Crosslinker* DSS (siehe Methodenteil 3.2.3.13) wiederholt. Bei diesem homobifunktionalen *Crosslinker* beträgt die Reichweite in etwa 11,4 Å. Somit ist ein *Crosslink* von Interaktionspartnern, die weiter als eine Atombindung voneinander entfernt sind, möglich, ohne jedoch völlig unspezifische Artefakte hervorzurufen.

Mit Hilfe von DSS war es nun möglich, nach Erhöhung des lysosomalen pH-Wertes durch Bafilomycin A1 Behandlung (siehe Methodenteil 3.2.3.13.1) LIMP-2 und β -GC intrazellulär miteinander zu vernetzen (siehe Abbildung 4.2-10). So konnte in murinen embryonalen Wildtyp Fibroblasten (+/+) nach der Behandlung mit DSS sowohl im LIMP-2 als auch im β -GC *Blot* eine Bande mit gleichem apparenten Molekulargewicht detektiert werden (rote Linie in Abbildung 4.2-10). Da diese Bande weder in LIMP-2 noch in β -GC defizienten Fibroblasten auftrat, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser Bande um einen Proteinkomplex aus je einem Molekül LIMP-2 und β -GC handelte.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass erst in Abwesenheit von β -GC ein LIMP-2 Homo-Dimer durch DSS stabilisiert werden konnte (siehe weißer Stern in Abbildung 4.2-10).

Die Daten aus den *Crosslink* Untersuchungen sprechen also dafür, dass LIMP-2 sowohl endogen als auch in Überexpression über einen „kurzen“ *Crosslinker* wie den Photo-Aminosäuren dimerisiert werden kann, wohingegen dies für β -GC nur in Überexpression der Fall ist. Für die 1:1 Verknüpfung von LIMP-2 und β -GC ist dagegen ein „weitreichender“ *Crosslinker* wie DSS notwendig.

Ergebnisse

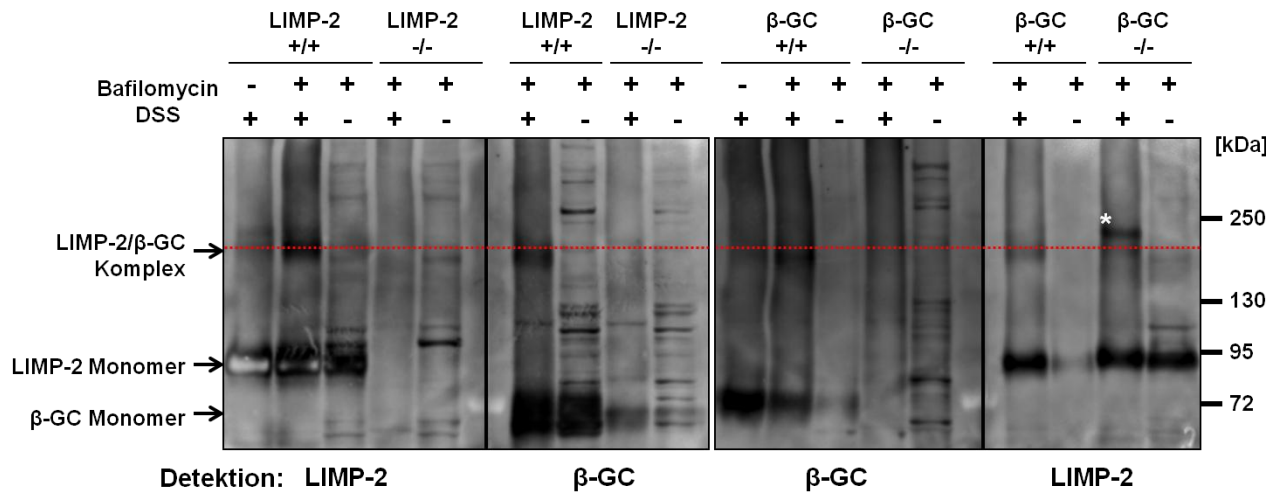


Abbildung 4.2-10: Western-Blots: Endogener intrazellulärer Crosslink mit DSS in LIMP-2 und β-GC defizienten murinen embryonalen Fibroblasten sowie Wildtyp Fibroblasten.

In Wildtyp Fibroblasten (LIMP-2 und β-GC +/+) konnte nach DSS *Crosslink* (+ DSS) sowohl im LIMP-2 als auch im β-GC *Blot* ein Signal gleichen apparenten Molekulargewichts detektiert werden. Dies deutet auf einen Heterokomplex aus je einem Molekül LIMP-2 und β-GC hin. Die Laufhöhe dieses Komplexes ist zum einem durch den linksseitigen Pfeil markiert als auch durch die gestrichelte rote Linie in den *Blots* hervorgehoben.

In β-GC defizienten Fibroblasten (β-GC -/-) tritt jedoch im Falle der LIMP-2 Detektion anstelle dieser Komplexbande eine Bande mit einem erhöhten apparenten Molekulargewicht auf (weißer Stern). Diese Bande ist in den Wildtyp Fibroblasten nicht präsent und wird als ein LIMP-2 Homodimer gedeutet. Aus den *Blots* wird auch deutlich, dass für den erfolgreichen DSS *Crosslink* eine Erhöhung des lysosomalen pH-Wertes durch Bafilomycin A1 Behandlung (+ Bafilomycin) notwendig ist. Aufgrund der stark erniedrigten β-GC Expression in den LIMP-2 defizienten Fibroblasten ist eine Aussage über eine mögliche Homo-Dimerbildung hier nicht möglich.

4.3 Vorbereitende Experimente zur Strukturaufklärung der luminalen Domäne von LIMP-2 und Einsicht in die Stöchiometrie des LIMP-2 / β -GC Komplexes

4.3.1 Rekombinante Produktion der luminalen LIMP-2 Domäne im prokaryontischen Expressionssystem

Um weitere Aussagen über die Struktur von LIMP-2 und die Stöchiometrie des LIMP-2 / β -GC treffen zu können, wurde der dem LIMP-2 Modell entsprechende Bereich der luminalen Domäne (hLIMP-2_R77-Y440, siehe Abbildung 4.1-1 und 4.1-2 A) im *E.coli* System exprimiert. Der Fermentationsprozeß wurde dabei mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. J. Grötzinger am Biochemischen Institut der CAU zu Kiel durchgeführt. Eine Produktbildung konnte nach Induktion nachgewiesen werden (Abbildung 4.3-1 A). Das exprimierte Protein lag in Form von *Inclusion bodies* vor (Abbildung 4.3-1 B). Während die Reinigung des Proteins noch erfolgreich verlief, konnten jedoch keine geeigneten Bedingungen für eine Zurückfaltung des Proteins gefunden werden, unter denen es nicht zur Präzipitation des Proteins gekommen wäre (Daten nicht gezeigt).

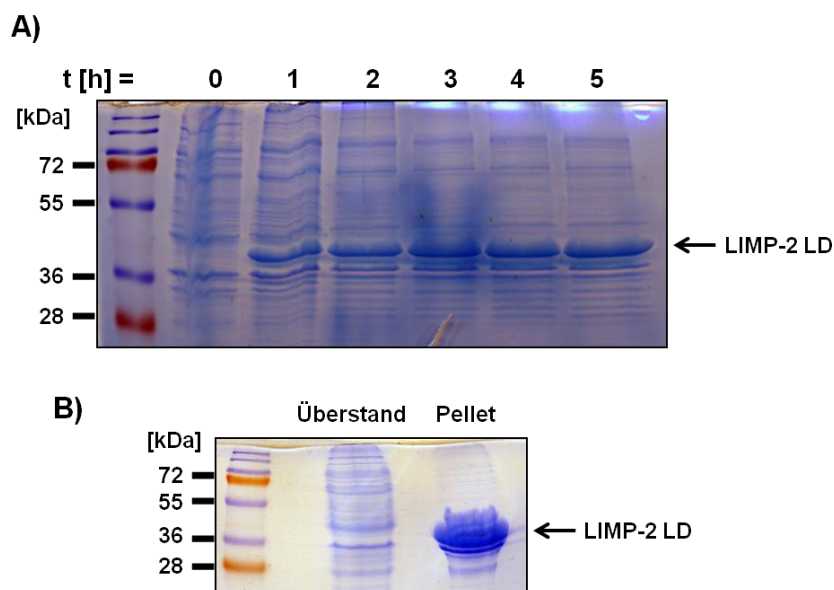


Abbildung 4.3-1: Coomassie-Färbung: Rekombinante Expression der luminalen LIMP-2 Domäne (hLIMP-2_R77-Y440) im *E.coli* Stamm BL21 und die Isolierung als *Inclusion bodies*.

(A) Gesamtzell-Lysat: Denaturierende SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung von Fermentationsproben. Nach Induktion mit IPTG zum Zeitpunkt $t = 0$ Stunden, ist in den stündlich gezogenen Kontrollproben die Produktbildung der luminalen LIMP-2 Domäne nachweisbar (LIMP-2 LD; rechtsseitiger Pfeil).

(B) Nach Aufschluss der Zellen ist das Produkt als *Inclusion bodies* isolierbar.

Ein Grund dafür könnte in der wie unter Abschnitt 4.1 gezeigten Notwendigkeit einer Glykosylierung des Proteins gelegen haben. Des Weiteren umfasste die zur Expression

gebrachte LIMP-2 Variante auch nicht die vollständige luminal Domäne von LIMP-2, so dass dadurch eine eventuelle Fehlfaltung des Proteins hervorgerufen wurde.

4.3.2 Rekombinante Produktion der luminalen LIMP-2 Domäne im eukaryontischen Expressionssystem

Um die Probleme einer mangelnden Glykosylierung zu umgehen, wurde ein eukaryontisches Expressionssystem ausgewählt (siehe Methodenteil 3.2.3.6). Im Zuge dessen wurde das Expressionskonstrukt von LIMP-2 entsprechend angepasst. Der Bereich von Aminosäure A32 bis E420 der humanen LIMP-2 Sequenz wurde in einen von Herrn Dr. K. Büssow, HZI Braunschweig, zur Verfügung gestellten Vektor für die stabile Expression in CHO Lec3.2.8.1 Zellen bzw. für die transiente Expression in suspensionsadaptierten HEK-6E Zellen eingefügt. Die Generierung von LIMP-2_A32-E420 stabil exprimierenden CHO Zellen war nicht erfolgreich, daher wurden zur Produktion des Proteins auf die transiente Expression in HEK-6E Zellen zurückgegriffen. Durch Zugabe von Kifunensin zum Zellkulturmedium wurde eine einheitliche Kernglykosylierung des Produktes erreicht (siehe Methodenteil 3.2.3.6), die die nachfolgende Analytik und vor allem eine mögliche spätere Kristallisation des Materials vereinfachte. LIMP-2_A32-E420 wurde als Sekretionsprotein, das entsprechende Sekretionssignal war N-terminal im Vektor enthalten und wurde nach Translation abgespalten, exprimiert und trug am C-Terminus ein HIS-Tag zur Vereinfachung der Reinigung (Abbildung 4.3-2).

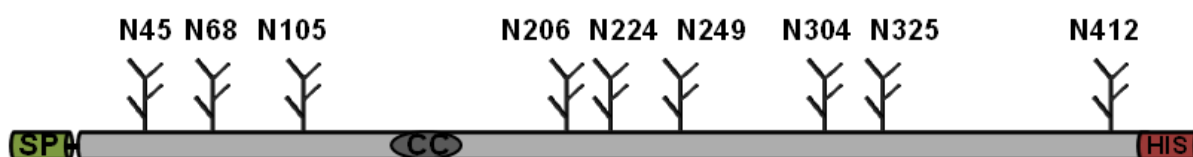


Abbildung 4.3-2: Schematische Darstellung des Expressionskonstruktes zur Produktion der luminalen LIMP-2 Domäne (hLIMP-2-A32-E420) als Sekretionsprotein mit C-terminalen HIS-Tag.

Das N-terminale Signalpeptid (SP) wird nach Translokation ins rER abgespalten. Die neun im Konstrukt gelegenen potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind ebenso dargestellt wie die dunkelgrau unterlegte *coiled-coil* Domäne (CC).

Der *Upstream* Prozess und die Affinitätschromatographie erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. K. Büssow HZI Braunschweig. Die sich anschließende Analytik (vergleiche Fließschema: Abbildung 3.2-2) wiederum wurde teilweise (v.a. die Größenausschlusschromatographie (SEC)) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. J. Grötzinger am Biochemischen Institut der CAU durchgeführt und ist im Folgenden dargelegt.

4.3.2.1 Die Expression der luminalen LIMP-2 Domäne führt zur Ko-Sekretion endogener β -GC

Die luminal Domäne (A32-E420) von LIMP-2 wurde als HIS-Tag markiertes Sekretionsprotein nach transienter Transfektion in HEK-6E Zellen, wie unter Abschnitt 3.2.3.6 dargelegt, exprimiert. Die Transfektionseffizienz lag bei etwa 55 %. Am Ende des Expressionsprozesses wurden 900 ml Zellkulturüberstand geerntet und nach Zentrifugation über eine NiNTA Affinitätschromatographie (IMAC; 3.2.3.7) (siehe Abbildung 4.3-3) gereinigt. Mittels Stoßelution mit 400 mM Imidazol haltigem Laufpuffer wurde das gebundene Protein von der Säulenmatrix eluiert.

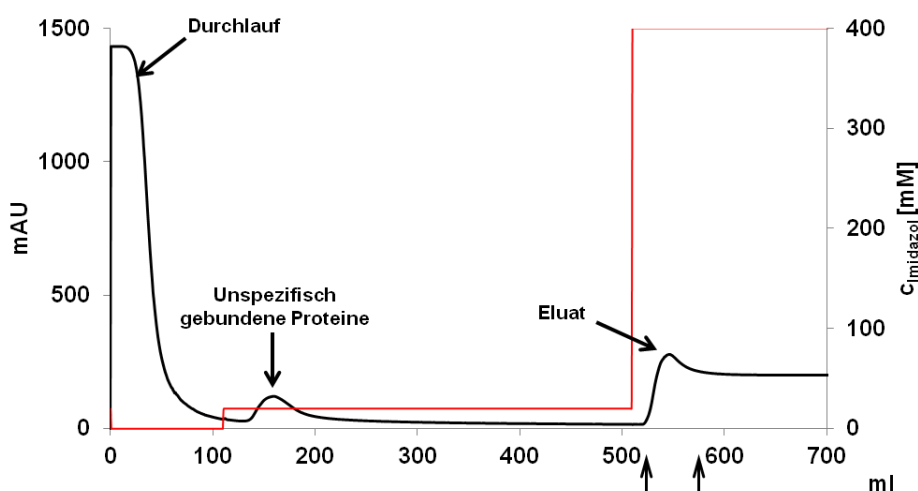


Abbildung 4.3-3: Affinitätschromatographie zur Reinigung von LIMP-2-A32-E420-HIS-Tag.

900 ml HEK293-6E Zellkulturüberstand wurden über eine selbstgepackte XK50/20 Säule mit 20 ml NiNTA Superflow, gereinigt. Die schwarze Kurve gibt den Verlauf der UV₂₈₀ Absorption wieder, die rote Kurve zeigt die Konzentration an Imidazol im Laufpuffer (50 mM Natriumphosphat Puffer mit 300 mM NaCl pH 7,6). Mittels Stoßelution, Erhöhung der Imidazolkonzentration im Waschpuffer von 20 mM auf 400 mM, wurde das an die Säule gebundene Protein eluiert. Die entsprechenden 10 ml Fraktionen (Bereich zwischen den beiden Pfeilen unterhalb der x-Achse) wurden aufgefangen und für die sich anschließende Analytik verwendet.

Die Eluatfraktionen wurden vereinigt und eine Probe mittels Coomassie-Gelanalyse und *Western-Blot* untersucht. Im Coomassie-Gel ist gut zu erkennen, dass die Probe relativ frei von Verunreinigungen, e.g. anderen Proteinen, war. Dennoch konnte im *Western-Blot* eine Ko-Sekretion von endogener β -GC nachgewiesen werden. Aufgrund vergleichbarer Molekulargewichte der maturen Proteine und der im Vergleich zum überexprimierten LIMP-2 Konstrukt geringeren Konzentration an β -GC, ließ sich dies nicht im Coomassie-Gel erkennen. Durch die Kifunensin Zugabe waren beide sezernierten Proteine aufgrund der nur erfolgten mannosereichen Kern-Glykosylierung sowohl PNGaseF als auch EndoH sensitiv (siehe Abbildung 4.3-4).

Ergebnisse

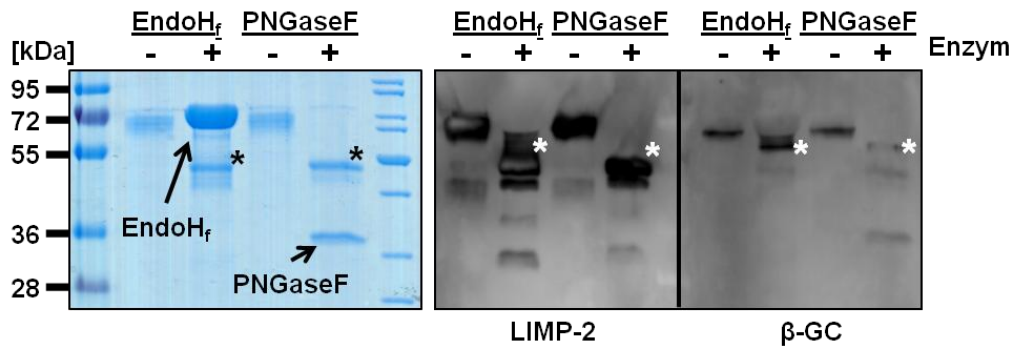


Abbildung 4.3-4: SDS-PAGE Analyse des Affinitätschromatographie-Eluats nach PNGaseF und EndoH_f Behandlung mittels Coomassie-Färbung und Western-Blot.

Das Proteineluat der Affinitätschromatographie wurde mittels EndoH_f bzw. PNGaseF Zugabe deglykosyliert (+) und anschließend per denaturierender SDS-PAGE aufgetrennt. Die Sterne kennzeichnen jeweils die deglykosylierte Form der jeweiligen Proteine.

(Links) Die Reinheit des Eluats und die Identität der luminalen LIMP-2 Domäne, anhand des apparenten Molekulargewichts der glykosylierten und deglykosylierten Form (schwarze Sterne), wurde mittels Coomassie Färbung analysiert. Die Lage der beiden Enzymbanden ist durch die beschrifteten Pfeile gegeben.

(Mitte) Detektion der luminalen LIMP-2 Domäne im Western-Blot als Identitätsnachweis. Die weißen Sterne zeigen die deglykosylierte Form an. Das sezernierte Protein ist dabei aufgrund der Expression unter Kifunensin Zugabe vollständig EndoH sensitiv.

(Rechts) Detektion der ko-sezernierten und ko-gereinigten endogenen β-GC. Diese ist in wesentlich geringer Konzentration als die überexprimierte luminal LIMP-2 Domäne im Eluat enthalten.

Theoretische Größen β-GC Isoform1 (long) deglykosylierter Polypeptidkern ohne Signalpeptid: 55,6 kDa. LIMP2-A32-E420-HIS-Tag deglykosyliert: 45,3 kDa.

4.3.2.2 Größenausschlusschromatographie des NiNTA gereinigten Zellkulturüberstandes

Die vereinigten Affinitätschromatographie-Eluatfraktionen wurden per Ultrafiltration (Ausschlussvolumen 30 kDa) eingengt und anschließend das Retentat einer SEC unterworfen (siehe Abbildung 4.3-5).

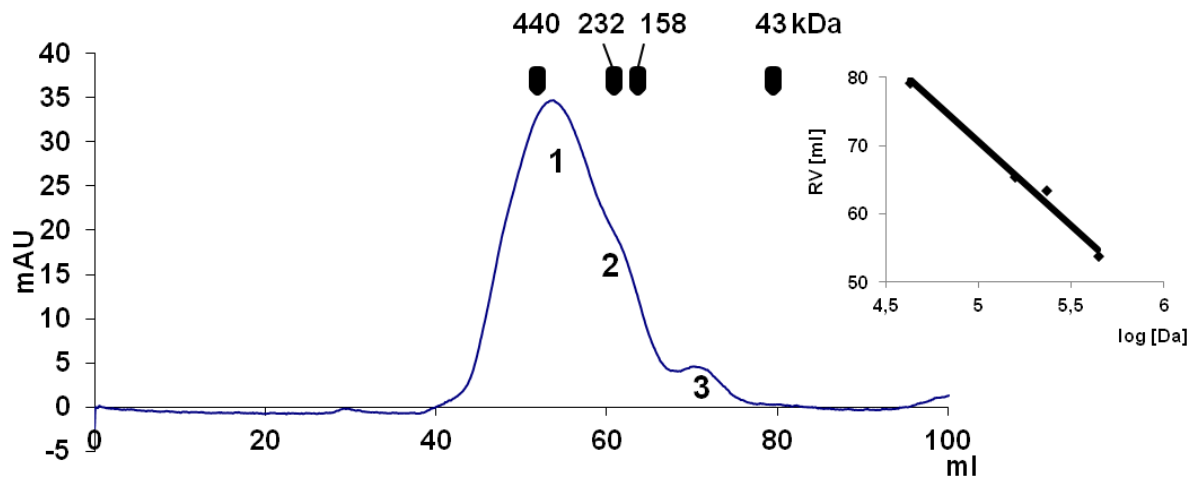


Abbildung 4.3-5: Repräsentativer UV₂₈₀ Kurvenverlauf der SEC des NiNTA Pools.

Bei der Gelfiltration des Eluats der Affinitätschromatographie mit einer Superdex200 Hiload 16/60 Säule ergibt sich ein Hauptmaximum (1) bei etwa 400 kDa, die „Schulter“ (2) bei etwa 250 kDa und das Nebenmaximum (3) bei etwa 110 kDa durch die UV₂₈₀ Detektion der Proteinabsorption. Dies entspricht vermutlich drei verschiedenen Proteinkomplexpopulationen, die in der Probe enthalten sind.

Die Markierungen oberhalb der Kurve spiegeln die Lage der Kalibrierungsproteine wider. Rechts ist die Kalibriergerade eingebettet.

Ergebnisse

In dieser konnte gezeigt werden, dass es drei stabile Subpopulationen gab, jedoch keinen eindeutigen LIMP-2_A32-E420 Monomer-Peak. In einer weiteren SEC in der die drei Subpopulationen einzeln analysiert wurden zeigte sich, dass es sich bei den Subpopulationen um stabile Populationen handelte, die nicht in einem Fließgleichgewicht zueinander bestanden (siehe Abbildung 4.3-6).

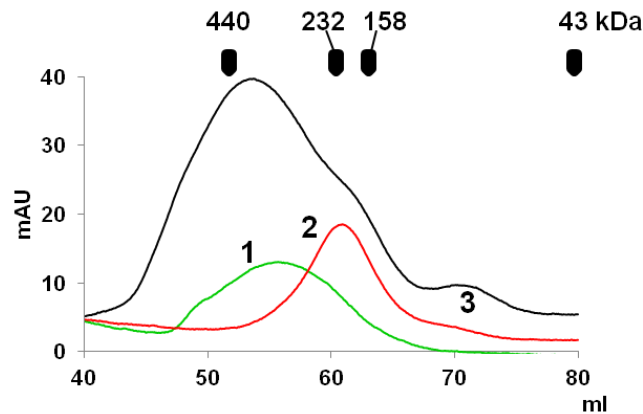


Abbildung 4.3-6: Overlay der UV₂₈₀ Kurvenverläufe der SEC der Subpopulationen 1 und 2.

Zwei der drei aus der Gelfiltration (vgl. oben) gewonnenen Subpopulationen wurden erneut per SEC untersucht. Die grüne Kurve entspricht der Subpopulation 1 (Hauptmaximum aus Abbildung 4.3-5), die rote Kurve der Subpopulation 2 (Schulter in Abbildung 4.3-5). Da von Subpopulation 3 nicht genügend Material für eine erneute SEC vorhanden war, ist die Lage dieser Subpopulation nur in der Ausgangskurve (schwarz) aus Abbildung 4.3-5 markiert. Die Markierungen oberhalb der Kurve spiegeln die Lage der Kalibrierungsproteine wider.

In allen drei *Peaks* konnte nach TCA-Fällung sowohl das LIMP-2 Protein als auch β -GC nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.3-7). Da über die NiNTA Reinigung eine Ko-Präzipitation der endogenen β -GC stattfand, deutete dies darauf hin, dass der *Peak* 3 mit einem kalkulierten Molekulargewicht von etwa 110 kDa einem LIMP-2 / β -GC Heterodimer entsprach. Der größte Anteil der Probe wies aber ein höheres Molekulargewicht auf, was auf das Vorliegen von größeren Komplexen aus LIMP-2 und β -GC in der Probe hindeutet.

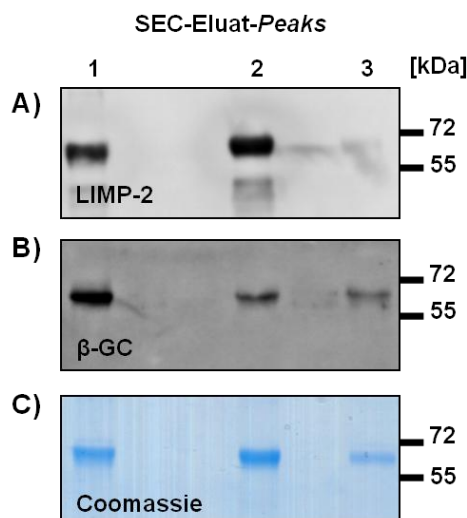


Abbildung 4.3-7: Analyse der SEC Subpopulationsfraktionen mittels Coomassie-Gelanalyse und Western-Blot nach TCA-Fällung.

Ergebnisse

(A) Detektion des LIMP-2 Konstrukts mit einem anti-HIS Antikörper (B) Detektion der endogenen β -GC, die durch die Überexpression und Sekretion der luminalen LIMP-2 Domäne ebenfalls sezerniert wurde und ko-gereinigt werden konnte. (C) Coomassie Färbung des SDS-PAGE Gels zum Nachweis der Reinheit der Fraktionen mit Fermentas PageBlue.

4.3.2.3 Analyse der SEC Subpopulationen und *Crosslink* mittels BS³

Bei der Analyse der SEC-Subpopulation 1 mittels denaturierender SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen konnte im *Western-Blot* nur ein Bandensignal mit dem apparenten Molekulargewicht für das monomere LIMP-2 Konstrukt detektiert werden.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen hingegen konnte das Vorliegen von über Disulfidbrücken vernetzten Proteinkomplexen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.3-8).

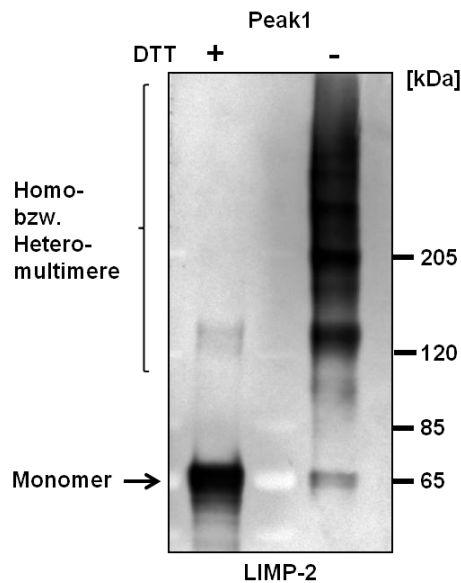


Abbildung 4.3-8: *Western-Blot*: Vergleich zwischen reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zum Nachweis von Disulfid verbrückten Proteinkomplexen in der SEC Subpopulationsfraktion 1.

Während unter reduzierenden Bedingungen (+DTT) die luminalen LIMP-2 Domäne in der SEC Subpopulationsfraktion 1 im *Western-Blot* als Monomer detektiert werden kann, zeigen sich unter nicht reduzierenden Bedingungen (- DTT) höhermolekulare Komplexe, die anscheinend auf eine Disulfid-Verbrückung der luminalen LIMP-2 Domäne zurückzuführen sind.

Durch vorherige Behandlung mit dem chemischen *Crosslinker* BS³, dem hydrophilen Sulfoanalog zu DSS (siehe Kapitel 3.2.3.13), konnten diese höhermolekularen Komplexe auch unter reduzierenden Bedingungen (+DTT) stabilisiert und per *Western-Blot* nachgewiesen werden. Vergleichbar der Vernetzung mit DSS (vgl. Abbildung 4.2-10) waren hier ebenso sowohl die luminalen LIMP-2 Domäne als auch die ko-sezernierte β -GC in den auftretenden Komplexen enthalten (Abbildung 4.3-9). Ob allerdings nur Hetero-Komplexe aus LIMP-2 und β -GC vorlagen oder auch Komplexe nur aus LIMP-2 bzw. β -GC konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Ergebnisse

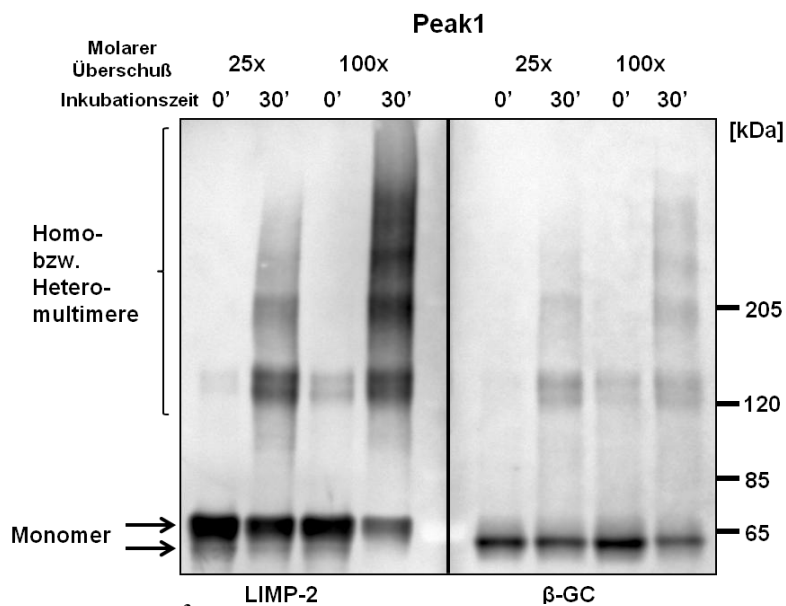


Abbildung 4.3-9: Western-Blot: BS³ Crosslink der SEC Subpopulationsfraktion 1.

Nach BS³ Behandlung der SEC Subpopulationsfraktion 1 können unter reduzierenden Bedingungen höhermolekulare Komplexe, die sowohl die luminalen LIMP-2 Domäne (links) als auch die ko-sezernierte endogene β -GC (rechts) enthalten, im Western-Blot detektiert werden. Aufgrund des nur geringen Unterschieds im apparenten Molekulargewicht der jeweiligen Monomere ist eine Unterscheidung zwischen dem Vorliegen von Homo- bzw. Heterokomplexen nicht möglich. BS³ wurde entweder im 25-fach oder im 100-fach molarem Überschuß eingesetzt und die Vernetzungsreaktion nach 30 Minuten gestoppt.

Die Ergebnisse eines BS³ Crosslinks mit reiner rekombinanter β -GC sprachen dafür, dass β -GC neben einer monomeren Konfiguration auch als Dimer vorliegen kann (Abbildung 4.3-10). Wie schon in Abschnitt 4.2 dargelegt, scheinen also LIMP-2 und β -GC jeweils Homodimere bilden zu können.

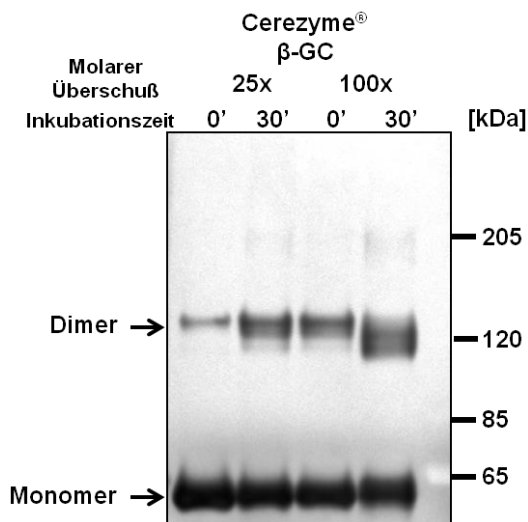


Abbildung 4.3-10: Western-Blot: BS³ Crosslink rekombinant hergestellter β -GC (Cerezyme[®]).

Rekombinant hergestellte β -GC (Cerezyme[®]) zeigt nach BS³ Behandlung eine verstärkte Dimerbande im Western-Blot. BS³ wurde im 25-fach bzw. 100-fach molarem Überschuß eingesetzt und die Vernetzungsreaktion nach 30 Minuten gestoppt.

4.3.3 Ko-Expression der luminalen LIMP-2 Domäne zusammen mit β -GC

Um genauere Ergebnisse hinsichtlich der Zusammensetzung der auftretenden Proteinkomplexe von LIMP-2_A32-E420 und β -GC zu gewinnen und eventuelle artifizielle Komplexe durch verschiedene Konzentrationen an LIMP-2_A32-E420 und β -GC zu verhindern, wurde durch die Ko-Expression von LIMP-2_A32-E420 und β -GC versucht beide Proteine in äquimolaren Mengen zu exprimieren. Dadurch sollte ein dem endogenen Zustand entsprechendes Verhältnis beider Proteine erreicht werden und somit die endogene Situation simuliert werden.

Der Zellkulturüberstand wurde analog wie bei der alleinigen Expression von LIMP-2_A32-E420 über eine NiNTA Affinitätschromatographie (IMAC; 3.2.3.7) gereinigt (siehe Abbildung 4.3-11). Die an die Säulenmatrix gebundenen Proteine wurden, nachdem unspezifisch gebundene Proteine mit 20 mM Imidazol haltigem Waschpuffer entfernt worden sind, mittels Stoßelution (400 mM Imidazol haltiger Laufpuffer) eluiert.

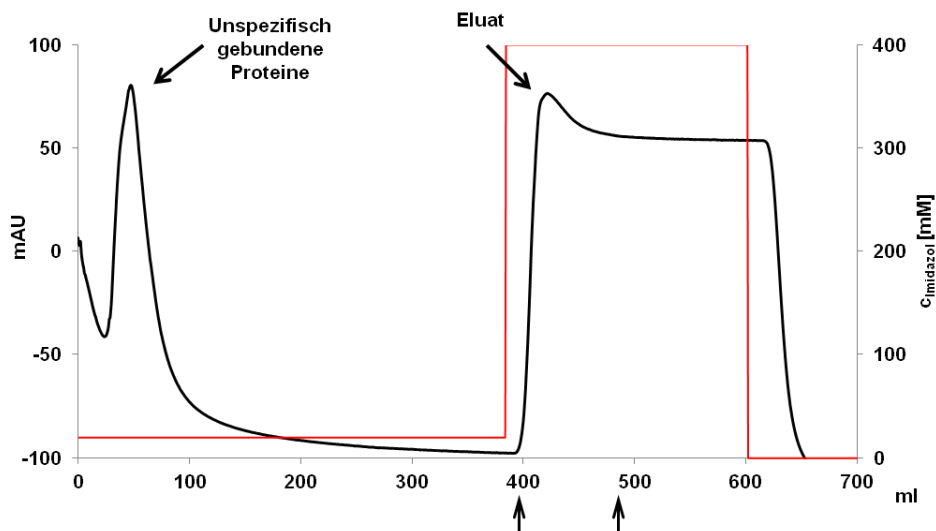


Abbildung 4.3-11: IMAC zur Reinigung von LIMP-2_A32-E420-HIS-Tag und ko-exprimierter β -GC.

400 ml HEK293-6E Zellkulturüberstand wurden über eine selbstgepackte XK50/20 Säule mit 20 ml NiNTA Superflow, gereinigt. Die schwarze Kurve gibt den Verlauf der UV₂₈₀ Absorption wieder, die rote Kurve zeigt die Konzentration an Imidazol im Laufpuffer (50 mM Natriumphosphat Puffer mit 300 mM NaCl pH 7,6). Mittels Stoßelution, Erhöhung der Imidazolkonzentration im Waschpuffer von 20 mM auf 400 mM, wurden die an die Säule gebundenen Proteine eluiert. Die entsprechenden 10 ml Fraktionen (Bereich zwischen den beiden Pfeilen unterhalb der x-Achse) wurden aufgefangen und für die sich anschließende Analytik verwendet.

4.3.3.1 SEC des NiNTA gereinigten Zellkulturüberstandes und die Analyse der Fraktionen

Nach Überprüfung, dass beide Proteine im Eluat der Affinitätschromatographie enthalten waren (Daten nicht gezeigt), wurde das Eluat durch Ultrafiltration konzentriert und mittels SEC aufgetrennt (siehe Abbildung 4.3-12). Während bei der alleinigen Überexpression des luminalen LIMP-2 Proteins ein dominantes Hauptmaximum bei etwa 400 kDa erkennbar war (vgl. Abbildung 4.3-12 *overlay*), zeigte sich bei der Ko-Expression mit β -GC eine zusätzliche

Ergebnisse

„Schulter“ (etwa bei 850 kDa) vor diesem Maximum. Allgemein konnte eine Verschiebung der Verhältnisse der einzelnen Subpopulationen untereinander festgestellt werden. Der erhoffte definierte einzelne LIMP-2 / β -GC Komplex *Peak* wurde durch die Ko-Expression nicht erreicht. Es handelte sich also bei den entstandenen Proteinkomplexen wieder um eine Mischung verschiedener Spezies.

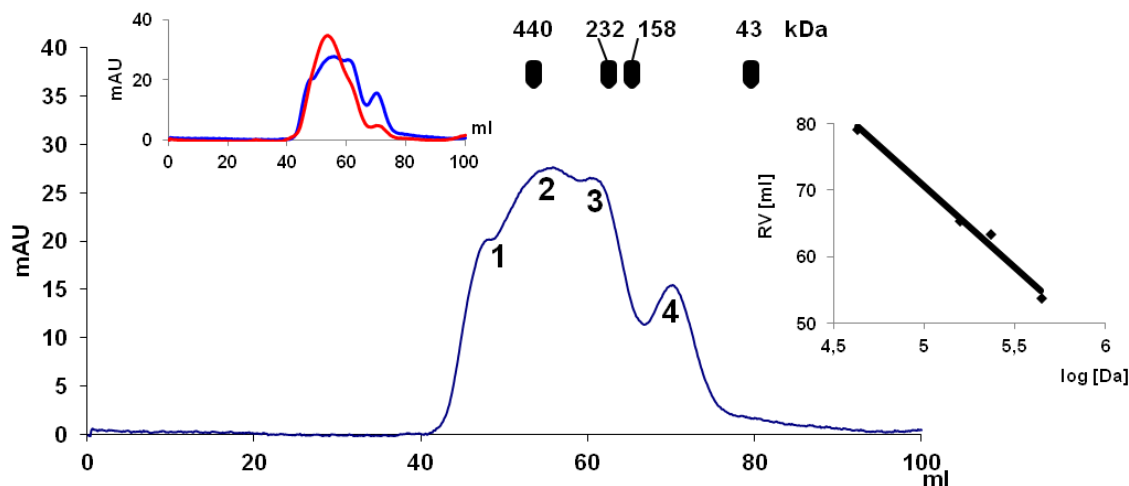


Abbildung 4.3-12: Repräsentativer UV₂₈₀ Kurvenverlauf der SEC des NiNTA Pools.

Bei der Gelfiltration des Eluats der Affinitätschromatographie mit einer Superdex200 Hiload 16/60 Säule kann die Probe in vier (1 bis 4) verschiedene Populationen aufgetrennt werden. So können im UV₂₈₀ Kurvenverlauf eine „Schulter“ (1) bei etwa 850 kDa, zwei Maxima (2 und 3) bei etwa 450 und 270 kDa und das Nebenmaximum (4) bei etwa 110 kDa erkannt werden.

Die Markierungen oberhalb der Kurve spiegeln die Lage der Kalibrierungsproteine wider. Rechts ist die Kalibrierungsgerade eingebettet. Links oben ist der Overlay mit dem sich ergebenden UV₂₈₀ Kurvenverlauf (rot) bei alleiniger Überexpression der luminalen LIMP-2 Domäne dargestellt.

Dies wurde durch die Auswertung des sich ergebenden Bandenmusters nach denaturierender SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen im Abgleich mit dem unter reduzierenden Bedingungen im Coomassie gefärbten Gel der verschiedenen SEC-Subpopulationsfraktionen bestätigt (siehe Abbildung 4.3-13). Offensichtlich haben sich Disulfid-verbrückte Proteinkomplexe aus den beiden monomeren Proteinen ausgebildet.

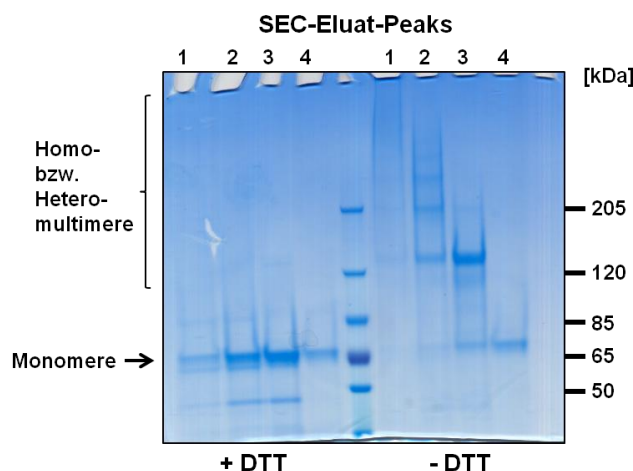


Abbildung 4.3-13: Analyse der SEC Subpopulationsfraktionen mittels denaturierender SDS-PAGE unter reduzierenden (+ DTT) und nicht reduzierenden (- DTT) Bedingungen und anschließender Coomassie-Färbung.

Ergebnisse

Unter reduzierenden Bedingungen (+DTT) sind in allen *Peaks* (1 bis 4) der SEC nur Monomer Signale mit einem apparenten Molekulargewicht des luminalen LIMP-2 und der β -GC zu erkennen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen (- DTT) zeigen sich in den SEC *Peaks* 1 bis 3 nur noch höher molekulare Banden, die ein um so höheres apparentes Molekulargewicht im Gel aufweisen, je geringer das Retentionsvolumen des entsprechenden SEC *Peaks* war. Währenddessen ist in *Peak* 4 weiterhin nur die Monomerbande zu sehen.

Im *Western-Blot* wurde dann ein Unterschied zwischen dem luminalen LIMP-2 Protein und der β -GC offensichtlich. Während β -GC in allen SEC-Populationen auch als Monomer unter nicht reduzierenden Bedingungen vorlag, war die luminale LIMP-2 Domäne in den vorderen höher molekularen SEC-Fractionen nur in den jeweiligen Banden mit erhöhten apparenten Molekulargewicht zu detektieren (siehe Abbildung 4.3-14). Für *Peak* 4 konnte eine 1:1 Zusammensetzung aus β -GC und der luminalen Domäne von LIMP-2 bestätigt werden, wie dies schon für den *Peak* 3 der SEC der alleinigen LIMP-2_A32-E420 Expression angenommen wurde (vgl. 4.3.2.2). Die Interaktion beider Proteine in diesem Komplex beruht anscheinend auch nicht auf Disulfidbrücken, da auch unter nicht reduzierenden Bedingungen nur ein Bandensignal mit dem apparenten Molekulargewicht der monomeren Proteine sowohl im Coomassie-Gel (Abbildung 4.3-13) als auch im jeweiligen *Western-Blots* zu detektieren war (Abbildung 4.3-14).

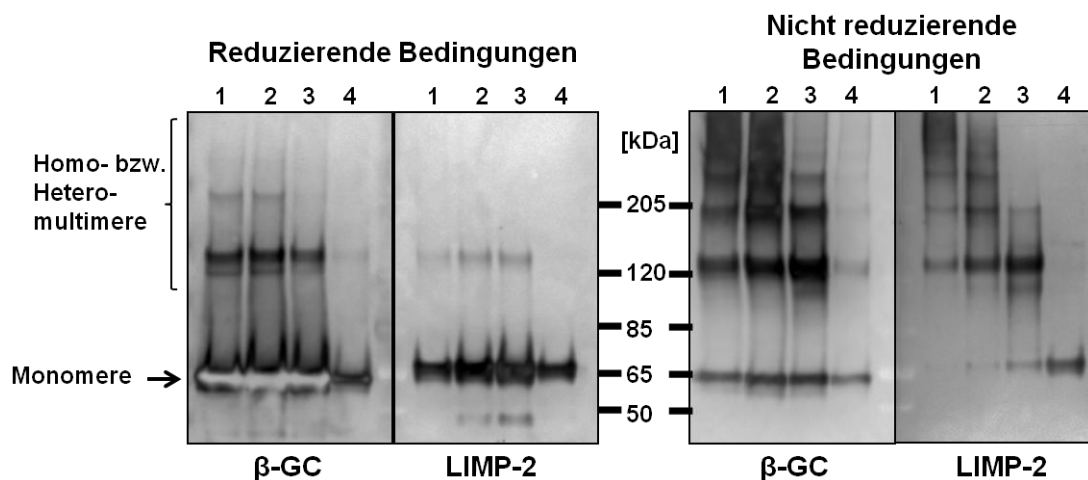


Abbildung 4.3-14: Western-Blots: Vergleich zwischen reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zum Nachweis von Disulfid verbrückten Proteinkomplexen in den SEC Subpopulationsfraktionen.

(Links) Sowohl das luminale LIMP-2 Domänenprotein als auch die ko-sezernierte und ko-gereinigte β -GC laufen in allen SEC Fraktionen (1 bis 4) unter reduzierenden (+DTT) in der denaturierenden SDS-PAGE nahezu vollständig als Monomer.

(Rechts) Erst unter nicht reduzierenden Bedingungen kommt es in den zuerst eluierenden SEC Fraktionen (1 bis 3) zur ausgeprägten Komplexbildung beider Proteine, die anscheinend auf der Ausbildung von Disulfidbrücken beruht. In Fraktion 4 liegen beide Proteine als Monomer vor.

Als Ausgangsmaterial für eine Kristallisation ist das gewonnene Material aufgrund der nicht homogenen Zusammensetzung eher ungeeignet. Darüber hinaus führte die Deglykosylierung des Materials mit EndoH zur Präzipitation (Daten nicht gezeigt).

4.4 Analyse synthetischer LIMP-2 Peptide

Wie aus den Ergebnissen des vorangegangenen Kapitels deutlich wird, erfolgt eine Interaktion zwischen LIMP-2 und β -GC alleine über die luminale LIMP-2 Domäne. In dieser ist ein *coiled-coil* Motiv (Aminosäure 152 bis 167) enthalten, dass als notwendig für die Bindung der β -GC erachtet wird (Reczek et al., 2007). Untersuchungen der AMRF hervorruhenden Trunktationsmutanten von LIMP-2 (Blanz et al., 2010) bestätigten dies.

Bisher konnte aber nicht geklärt werden, ob diese Domäne alleine das Potential besitzt β -GC zu binden oder nicht. Um nähere Einblicke bezüglich der Bindung, auch auf struktureller Ebene, zwischen LIMP-2 und seinem primären Interaktionspartner β -GC zu gewinnen, wurden synthetische Peptide mit der humanen Aminosäuresequenz der *coiled-coil* Domäne (siehe Kapitel 3.1.9) von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin bezogen und für die Analysen verwendet.

4.4.1 Analyse der Sekundärstruktur von LIMP-2_L152-V173 mittels CD-Spektroskopie

In einem ersten Schritt wurde das rekonstruierte LIMP-2_L152-V173 Peptid (siehe Kapitel 3.1.9 und 3.2.3.1) mittels CD-Spektroskopie hinsichtlich seiner Sekundärstruktur untersucht. Das sich ergebende Spektrum deutet auf eine nahezu ideale α -helikale Konformation des Peptides hin (vgl. Kapitel 3.2.3.3). So weist das Spektrum einen für α -helikale Strukturen typischen Verlauf mit Minima bei $\lambda = 207$ nm und 222 nm sowie einem Maximum bei $\lambda = 192$ nm auf (Abbildung 4.4-1).

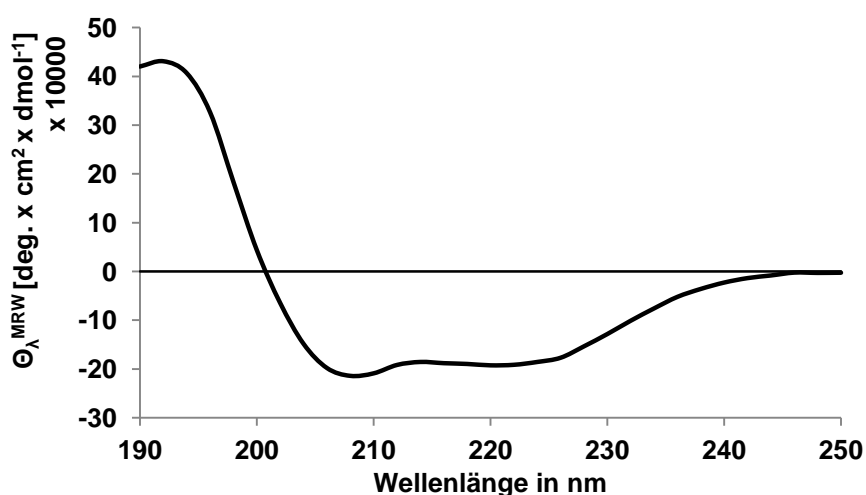


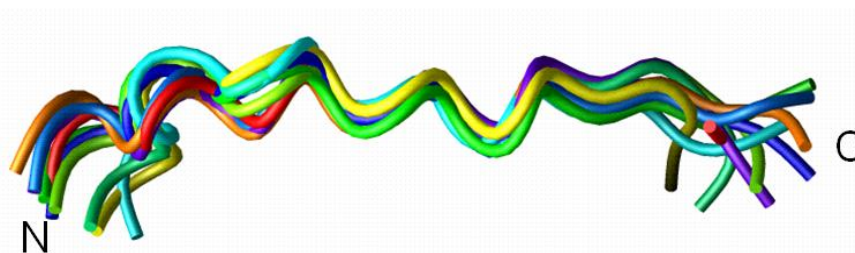
Abbildung 4.4-1: Normiertes CD-Spektrum des LIMP-2_L152-V173 Peptides.

Das CD-Spektrum des LIMP-2_L152-V173 Peptides weist auf eine α -helikale Faltungsstruktur des Peptides hin. Das dargestellte Spektrum beruht auf der Mittelung von drei aufeinander folgenden Messungen abzüglich des Pufferspektrums als Basislinie. Alle Messungen fanden in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5 bei 20°C statt.

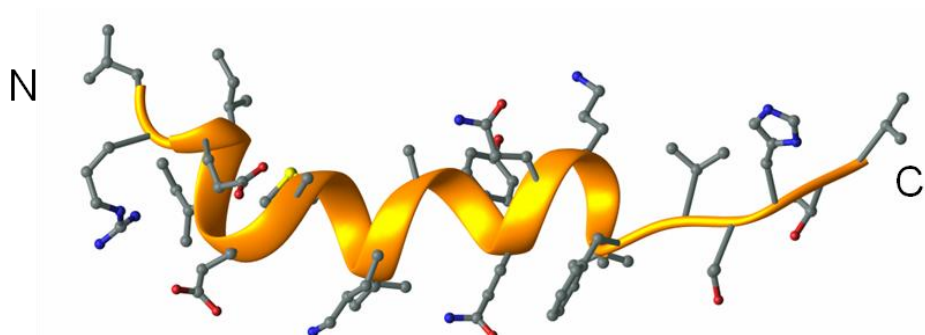
4.4.2 Analyse der Tertiärstruktur von LIMP-2_L152-V173 mittels NMR-Spektroskopie

Die genaue Faltung bzw. Tertiärstruktur des Peptides in Lösung konnte per Kernspinresonanzspektroskopie aufgeklärt werden. Nach Auswertung der durch die NMR-Messung generierten Daten und NOESY-Spektren sowie deren Prozessierung ergab sich die in Abbildung 4.4-2 graphisch dargestellte Struktur des LIMP-2_L152-V173 Peptides. Deutlich ist das α -helikale Motiv zu erkennen. Die postulierte α -helikale Struktur der *coiled-coil* Domäne (Reczek et al. 2007) und die Messung der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie konnten somit verifiziert werden.

A



B



L R E I I E A M L K A Y Q Q K L F V T H T V

Abbildung 4.4-2: Tertiärstruktur des LIMP-2_L152-V173 Peptides.

(A und B) Die mittels NMR Spektroskopie aufgeklärte Tertiärstruktur des LIMP-2_L152-V173 Peptides bestätigt die postulierte α -helikale Faltung sowie den *coiled-coil* Domänen Charakter des dem Peptid entsprechenden LIMP-2 Bereiches.

(A) *Spaghetti*-Präsentation des Ensembles der 10 Strukturen mit der niedrigsten Zielfunktion. (B) Darstellung der mittleren Struktur des LIMP-2_L152-V173 Peptides inklusive der Seitenketten. Primärsequenz des Peptides ist im Einbuchstabencode angegeben. N und C bezeichnen N- und C-Terminus. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Jung (Arbeitsgruppe Prof. Dr. J.Grötzinger; Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) und Prof. Dr. F. Sönnichsen (Otto-Diels Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).

4.4.3 Analyse des LIMP-2_L152-V173 Peptids mittels SEC

Da *coiled-coil* Motive in der Regel als Dimerisierungsdomänen fungieren (Lupas, 1996), sollte mittels SEC eine mögliche Dimer- bzw. Oligomerbildung des isolierten Peptides überprüft werden. Der sich durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 214$ nm ergebende Kurvenverlauf ist in Abbildung 4.4-3 dargestellt. Zu erkennen ist, dass das Peptid keinen symmetrischen Eluatpeak sondern einen *Tailingeffekt* aufweist, bei dem der *Peak*-Abfall flacher verläuft als der *Peak*-Anstieg. Aus einem Retentionsvolumen von 13,85 ml ergibt sich mittels der Kalibrier-Geradengleichung eine relative Masse von etwa 3350 Da für das LIMP-2_L152-V173 Peptid. Das theoretische sich aus der Primärsequenz ergebende Molekulargewicht des Peptides liegt bei 2673 Da, so dass von einer monomeren Konformation des Peptides ausgegangen werden kann.

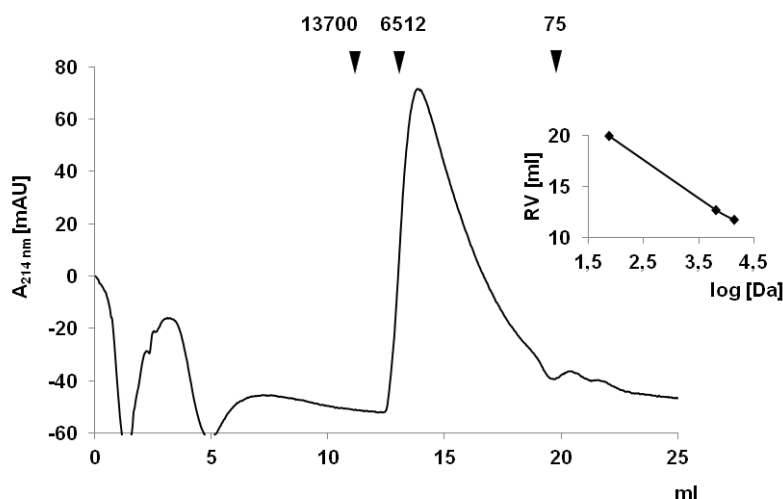


Abbildung 4.4-3: Größenausschlusschromatographie des LIMP-2 *coiled-coil* Peptides LIMP-2_L152-V173.

Zur Analyse wurde eine SuperdexPeptid Säule 10/300 GL und 50 mM Natriumacetat Puffer pH 4,7 verwendet. Die Molekulargewichte der zur Kalibrierung der Säule eingesetzten Standardsubstanzen und die Lage ihrer Retentionsvolumina (RV) sind oberhalb des UV₂₁₄ Kurvenverlaufes des analysierten Peptides dargestellt. Die sich ergebende Standardgerade ist rechts in der Abbildung eingebettet.

Die Analyse des LIMP-2_L152-V173 Peptides zeigte somit, dass es sich bei dem putativen *coiled-coil* Motiv in der Tat um eine α -helikale Struktur innerhalb des LIMP-2 Proteins handelt. Eine Dimerisierung oder Oligomerisierung konnte aber hingegen für das isolierte Peptid an sich nicht gezeigt werden. Dies spricht unter anderem dafür, dass die beobachtete Homo-Dimerisierung von LIMP-2 nicht über das *coiled-coil* Motiv vermittelt wird. Vielmehr scheint das Motiv, wie schon gezeigt und bei Reczek *et al.* 2007 und Blanz *et al.*, 2010 beschrieben, essentiell für die Bindung zwischen LIMP-2 und seinem primären Interaktionspartner β -GC zu sein.

4.4.4 Analyse der Sekundärstruktur eines Biotin gelabelten LIMP-2 Peptides mittels CD-Spektroskopie

Um zu klären, ob dieses Motiv alleine auch ausreichend ist β -GC zu binden, wurde im nachfolgenden mit einer N-terminal biotinylierten Variante des LIMP-2 Peptides gearbeitet: Biotin-Ttds-LIMP-2_L152-E175 (siehe 3.1.9). Dieses Peptid war darüber hinaus auch um zwei Aminosäuren am C-Terminus länger als die Variante ohne Biotin-Tag. Nach Rekonstitution des zuvor in 0,1 % iger HCl aufgenommenen Peptides in 50 mM Natriumphosphat Puffer mit 150 mM Natriumchlorid pH 7 wurde die korrekte α -helikale Sekundärstrukturausbildung mittels CD-Spektroskopie überprüft und bestätigt (siehe Abbildung 4.4-4).

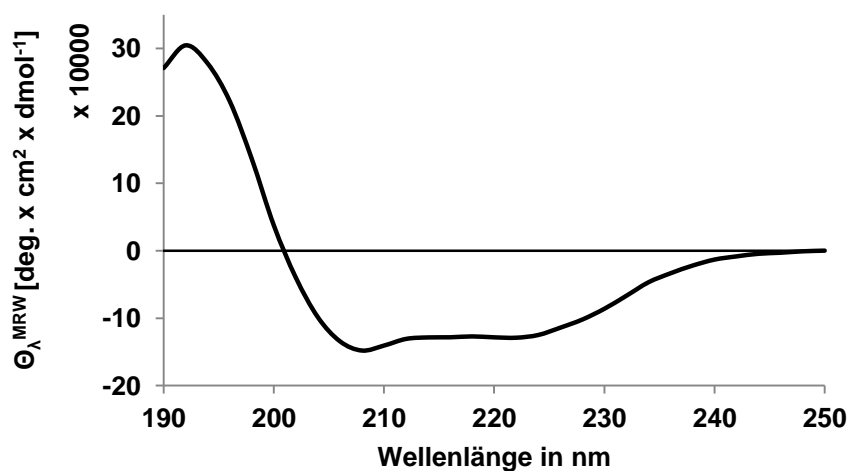


Abbildung 4.4-4: Normiertes CD-Spektrum des Biotin-Ttds-LIMP-2_L152-E175 Peptides.

Das CD-Spektrum des Biotin-Ttds-LIMP-2_L152-E175 Peptides weist auf eine α -helikale Faltungsstruktur des Peptides hin. Das dargestellte Spektrum beruht auf der Mittelung von drei aufeinander folgenden Messungen abzüglich des Pufferspektrums als Basislinie. Alle Messungen fanden in 50 mM Natriumphosphat Puffer mit 150 mM Natriumchlorid pH 7 bei 20°C statt.

4.4.5 Analyse des mit Biotin gelabelten LIMP-2 Peptides mittels SEC

Mittels SEC wurde anschließend die Konformation des Biotin gelabelten Peptides untersucht. Im Gegensatz zum Peptid ohne Biotin-Tag erschien dieses Peptid wesentlich größer, möglicherweise aufgrund einer Oligomerisierung (siehe Abbildung 4.4-5). Mit einem Retentionsvolumen von 10,84 ml ergab sich eine relative Masse von etwa 16200 Da bei einem theoretischen Molekulargewicht für das monomere Molekül von 3404 Da. Es könnte somit ein Tetra- oder Pentamer vorliegen. Vergleichbar dem unbiotinylierten Peptid konnte ebenfalls ein Kurvenverlauf mit *Tailingeffekt* festgestellt werden.

Ergebnisse

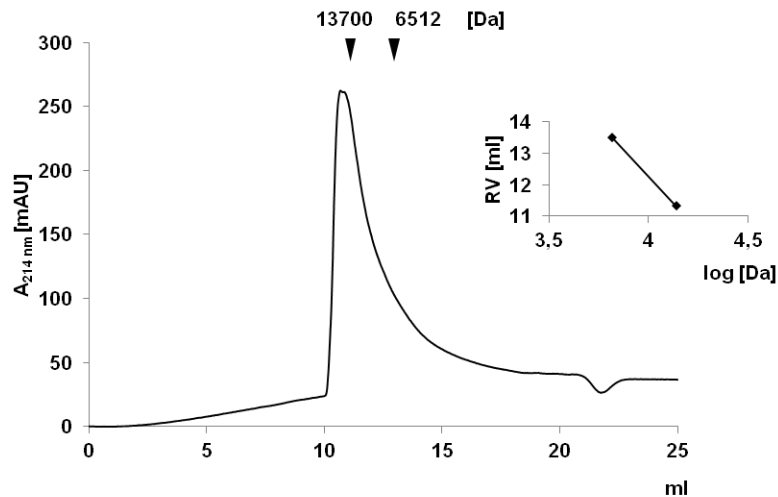


Abbildung 4.4-5: Größenausschlusschromatographie des biotinylierten LIMP-2 *coiled-coil* Peptides Biotin-Ttds-LIMP-2_L152-E175.

Zur Analyse wurde eine SuperdexPeptid Säule 10/300 GL und 50 mM Natriumphosphat Puffer mit 150 mM Natriumchlorid pH 7 verwendet. Die Molekulargewichte der zur Kalibrierung der Säule eingesetzten Standardsubstanzen und die Lage ihrer Retentionsvolumina (RV) sind oberhalb des Kurvenverlaufes des analysierten Peptides dargestellt. Die sich ergebende Standardkurve ist rechts in der Abbildung eingebettet.

4.4.6 Das biotinylierte LIMP-2 *coiled-coil* Peptid bindet spezifisch rekombinante β -GC

Um die funktionelle Eigenschaft der β -GC Bindung des Peptides zu untersuchen, wurde dieses über seinen Biotin-Tag an Streptavidin-Agarose *beads* gebunden. Anschließend konnte überprüft werden, ob es möglich war, rekombinant hergestellte β -GC (Imiglucerase, Handelsname Cerezyme[®] 400U; Genzyme GmbH, Neu-Isenburg) zu präzipitieren (Schema siehe Abbildung 4.4-6).

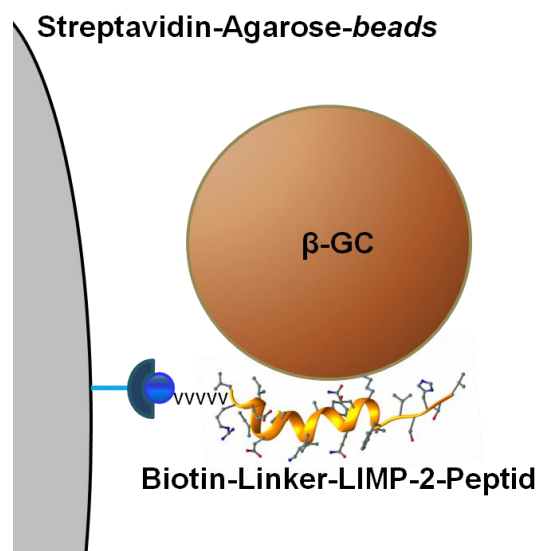


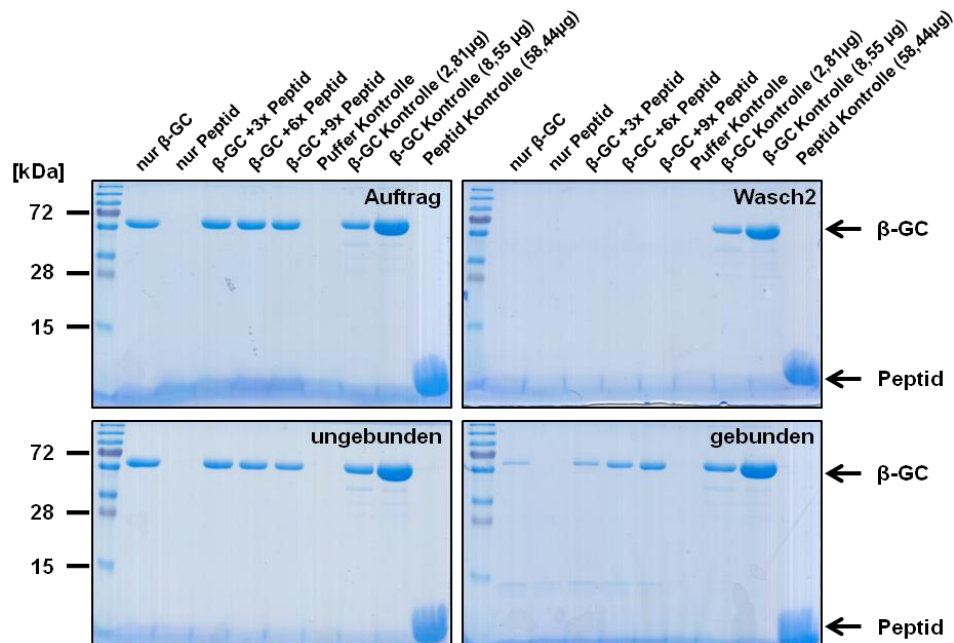
Abbildung 4.4-6: Schematische Darstellung der Ko-Präzipitation von β -GC durch das biotinylierten LIMP-2 *coiled-coil* Peptid Biotin-Ttds-LIMP-2_L152-E175 über Streptavidin-Agarose *beads*.

Das N-terminal biotinylierte LIMP-2 Peptid wird durch die nichtkovalente Wechselwirkung des Biotin *Tags* (bläuliche Kugel) mit dem kovalent an die Agarose *beads* gebundenen Streptavidin präzipitiert. Zusammen mit dem Peptid wird dann auch die rekombinante β -GC ko-präzipitiert.

Ergebnisse

Das Peptid und die β -GC wurden über Nacht miteinander inkubiert und anschließend mit Streptavidin-Agarose *beads* präzipitiert. Die erfolgreiche Ko-Präzipitation von β -GC wurde per denaturierender SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nachgewiesen. Es zeigte sich, dass es möglich war durch das Peptid die β -GC zu präzipitieren. Je höher dabei der molare Überschuss an Peptid war desto größer war auch die ko-präzipitierte β -GC Menge (siehe Abbildung 4.4-7). Da zuvor in der Literatur eine pH-Wert abhängige Interaktion von LIMP-2 und β -GC diskutiert wurde, bei der es unter niedrigen lysosomalen pH-Wert Bedingungen zur Trennung von LIMP-2 und β -GC kommt (Reczek et al., 2007), wurde der Versuch der β -GC Ko-Präzipitation in einem Puffersystem mit niedrigem pH-Wert (pH 5) wiederholt. In Bezug auf die ko-präzipitierte β -GC Menge machte es jedoch keinen Unterschied ob beim Assay mit Waschpuffern eines pH-Wertes von pH 7 oder pH 5 gearbeitet wurde (Daten nicht gezeigt). Eine pH-Wert abhängige Interaktion von Peptid und β -GC kann somit ausgeschlossen werden.

A



B

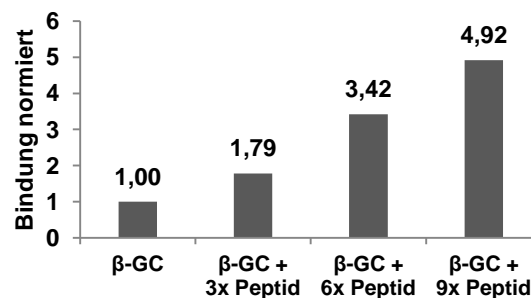


Abbildung 4.4-7: Konzentrationsabhängige Ko-Präzipitation von rekombinanter β -GC durch ein biotinyliertes LIMP-2 coiled-coil Peptid.

(A) Coomassie-Färbung denaturierender SDS-PAGE Gele zur Verlaufsverfolgung der konzentrationsabhängigen Ko-Präzipitation von rekombinanter β -GC durch das biotinylierte LIMP-2 coiled-coil Peptid (3x; 6x und 9 fach

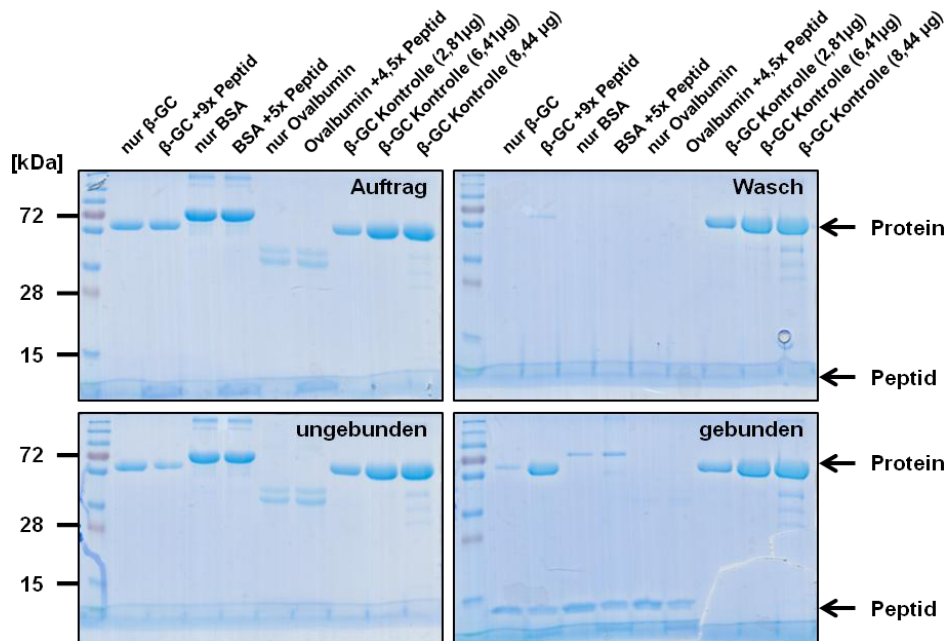
Ergebnisse

molarer Überschuß). Deutlich zu erkennen ist die Abnahme des ungebundenen Anteils an β -GC im Coomassie-Gel ‚ungebunden‘ und die damit einhergehende Zunahme von ko-präzipitierter β -GC in den Fraktionen mit höherer Peptidkonzentration im Coomassie Gel ‚gebunden‘.

(B) Quantifizierung des Coomassie Gels ‚gebunden‘ aus (A). Die gebundene Menge an rekombinanter β -GC ist dabei normiert auf die unspezifisch an die Streptavidin-Agarose *beads* gebundene Menge an β -GC (Spur „nur β -GC“). Durch Zugabe des Peptids wird demnach konzentrationsabhängig die 1,8 bis 4,9 fache Menge an β -GC in diesem Einzel-Experiment präzipitiert.

Die Spezifität der Interaktion des LIMP-2 *coiled-coil* Peptides und der β -GC konnte in einem Kontrollexperiment mit BSA und Ovalbumin gezeigt werden (siehe Abbildung 4.4-8 A). Während die β -GC spezifisch präzipitiert wurde, konnte für BSA und Ovalbumin keine Ko-Präzipitation in dem Maße wie für die β -GC festgestellt werden (Abbildung 4.4-8 B).

A



B

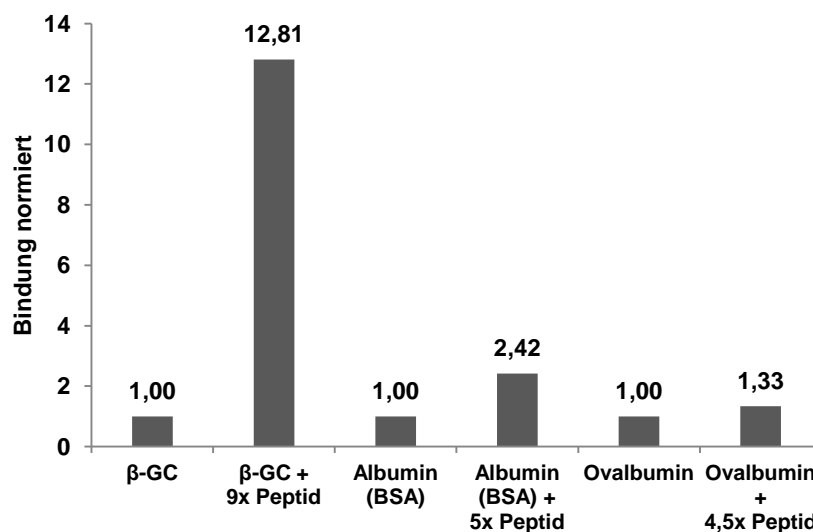


Abbildung 4.4-8: Überprüfung der Spezifität der Ko-Präzipitation von rekombinanter β -GC durch ein biotinyliertes LIMP-2 *coiled-coil* Peptid.

(A) Coomassie-Färbung denaturierender SDS-PAGE Gele zur Verlaufsverfolgung der spezifischen Ko-Präzipitation von rekombinanter β -GC durch das biotinylierte LIMP-2 *coiled-coil* Peptid. In allen Ansätzen mit

Peptidzusatz war dieselbe Menge an Peptid enthalten. Aufgrund der unterschiedlichen Proteingröße und Molarität der Proteinlösungen waren jedoch die molaren Verhältnisse unterschiedlich (9 facher Überschuß bei β -GC, 5 fach bei BSA und 4,5 fach bei Ovalbumin). Dennoch ist beim Vergleich der Proben ohne („nur“) und mit Zusatz des Peptides sowohl innerhalb eines Proteins als auch untereinander die Spezifität des Peptides gegenüber der rekombinanten β -GC offensichtlich, siehe Coomassie Gel rechts unten ‚gebunden‘.

(B) Quantifizierung des Coomassie Gels ‚gebunden‘ aus (A). Die durch das LIMP-2 Peptid gebundenen Mengen des jeweiligen Proteins sind dabei normiert auf die unspezifisch an die Streptavidin-Agarose *beads* gebundene Menge des jeweiligen Proteins. Durch Zugabe des LIMP-2 Peptids wird im Vergleich zu BSA und Ovalbumin der präzipitierte Anteil an β -GC wesentlich stärker und somit spezifischer in diesem Einzel-Experiment erhöht.

4.4.7 Die Interaktion mit dem biotinylierte LIMP-2 *coiled-coil* Peptid führt zu einer erhöhten Enzymaktivität der rekombinanten β -GC

Bei der Überprüfung der Enzymaktivität der durch das LIMP-2 *coiled-coil* Peptid präzipitierten β -GC stellte sich heraus, dass die ko-präzipitierte β -GC nicht nur enzymatisch aktiv war, sondern auch, dass in den als Kontrolle mitgeführten Auftragsproben β -GC eine höhere Aktivität in der Probe mit Peptid-Zusatz aufwies als in dem alleinigen β -GC Ansatz (siehe Abbildung 4.4-9). Dabei scheint die Aktivitätszunahme ab einer gewissen Peptid Konzentration zu stagnieren. Dies könnte aber auch auf die vollständige Umsetzung des Substrates zurückzuführen sein.

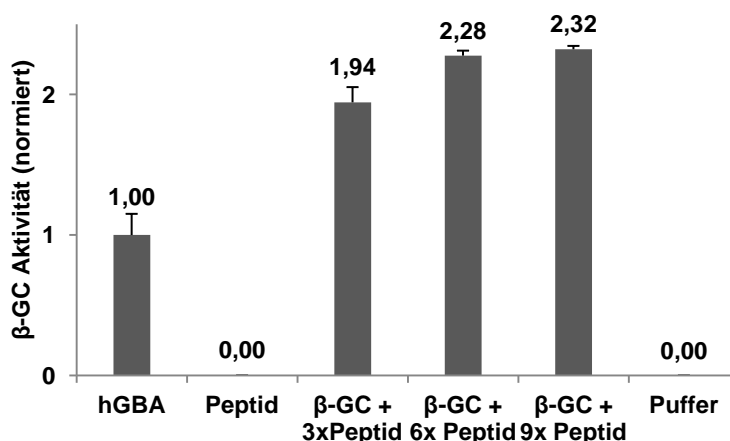


Abbildung 4.4-9: Quantifizierung des β -GC Aktivitätsassays.

Durch Zugabe des LIMP-2 Peptides in verschiedenen molaren Überschüssen konnte die Enzymaktivität von rekombinanter β -GC in etwa verdoppelt werden (1,94 fach bis 2,32 fach). Der Quantifizierung liegen je vier Messwerte zugrunde bei denen es sich um technische Replikate eines Ansatzes handelt (Assaydurchführung in Doppelbestimmung und photometrische Auswertung ebenso in Doppelbestimmung). Normiert wurde auf die gemessene Enzymaktivität bei alleinigem Vorliegen der rekombinanten β -GC. Da es sich bei dem Versuch nur um einmalige Wiederholung mit technischen Replikaten handelte, wird an dieser Stelle keine Signifikanz angegeben, sondern nur die Standardabweichung graphisch dargestellt.

Eine Wiederholung des β -GC Aktivitätsassays bestätigte diese Beobachtung, wobei die Steigerung im Vergleich zur Erstbeobachtung hier höher ausfiel (siehe Abbildung 4.4-10).

Ergebnisse

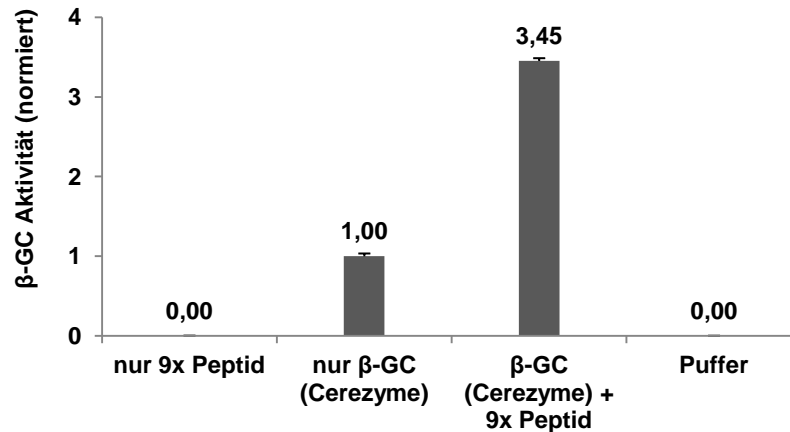


Abbildung 4.4-10: Quantifizierung des β-GC Aktivitätsassays.

Durch Zugabe des LIMP-2 Peptides im neunfach molaren Überschuß konnte die Enzymaktivität von rekombinanter β-GC um den Faktor 3,45 gesteigert werden. Der Quantifizierung liegen je sechs Messwerte zugrunde bei denen es sich um technische Replikate eines Ansatzes handelt (Assaydurchführung in Dreifachbestimmung und photometrische Auswertung in Doppelbestimmung). Normiert wurde auf die gemessene Enzymaktivität bei alleinigem Vorliegen der rekombinanten β-GC. Da es sich bei dem Versuch nur um einmalige Wiederholung mit technischen Replikaten handelte, wird an dieser Stelle keine Signifikanz angegeben, sondern nur die Standardabweichung graphisch dargestellt.

Die LIMP-2 *coiled-coil* Domäne ist also in der Tat in der Lage die alleinige Interaktion mit der β-GC zu vermitteln und darüber hinaus sogar als isoliertes Peptid die Aktivität der β-GC zu erhöhen. Es sei hier aber angemerkt, dass der Prozentsatz an präzipitierter β-GC im Vergleich zur eingesetzten β-GC Menge relativ gering war und maximal etwa 10 Prozent betrug. Scheinbar spielen also auch noch andere Bereiche von LIMP-2 eine Rolle bei der Interaktion mit der β-GC.

5 Diskussion

5.1 Der Glykosylierungsstatus von LIMP-2 und sein Einfluss auf das Protein

5.1.1 Bedeutung der Glykosylierung als ko-/posttranslationale Modifikation von Proteinen

Die Glykosylierung ist die am häufigsten vorkommende ko- bzw. posttranslationale Modifikation von im rER synthetisierten Proteinen und spielt in ihrer Gesamtheit in unterschiedlichsten Prozessen eine wichtige Rolle (Helenius and Aebi, 2001 und 2004). So kann eine Glykosylierung von Proteinen zum einen entscheidend für die Funktion des jeweiligen Proteins sein (Lenertz et al., 2010), zum anderen aber auch Stabilität (Waetzig et al., 2010), Struktur oder aber den Transport des jeweiligen Proteins beeinflussen (Taylor and Drickamer, 2003). Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor abhängige Transportweg löslicher lysosomaler Hydrolasen (siehe Kapitel 1.4.1) sei hier als ein Beispiel eines solchen auf der Glykosylierung basierenden Transportweges genannt. Die Struktur bzw. vielmehr die Faltung (Parodi, 2000) eines Proteins kann im Falle der im rER ablaufenden N-Glykosylierung sowohl direkt durch die Anheftung der Kohlenhydratkette induziert werden (Mitra et al., 2006), als auch in einer Art Qualitätskontrolle durch die Interaktion mit den beiden Lectin-Chaperonproteinen Calnexin und Calreticulin reguliert (Trombetta and Helenius, 1998) und Zwischenstufen stabilisiert werden (Shental-Bechor and Levy, 2008). Fehlgefaltete Proteine werden dadurch zum Beispiel auch der ER-assoziierten Degradation (ERAD) zugeführt (Smith et al., 2011).

Schon 1986 zeigten Barriocanal *et al.*, dass die Glykosylierung einen entscheidend Einfluss auf LIMP-2 hat. Normalerweise konnte LIMP-2 innerhalb von einer bis zwei Stunden nach Translation im Lysosom nachgewiesen werden. In Tunicamycin behandelten Zellen, in denen durch die Inhibition der GlcNAc-1-Phosphotransferase (GPT) (Esko and Bertozzi, 2009) die N-Glykosylierung verhindert wurde, konnte jedoch keine signifikante lysosomale Population von LIMP-2 festgestellt werden. Auch die Halblebenszeit des Proteins war mit einer Stunde gegenüber 20 Stunden in unbehandelten Zellen drastisch reduziert. Ob die Ergebnisse für LIMP-2 die Konsequenz einer Fehlfaltung des Proteins im rER, einer Störung des lysosomalen Transportes oder aber einer verringerten Resistenz des nativen Proteins gegenüber den lysosomalen Hydrolasen war, blieb unklar (Barriocanal et al., 1986).

Generell sind Proteine mit einer größeren Anzahl an Glykosylierungen eher abhängig von diesen hinsichtlich einer korrekten Faltung (Helenius and Aebi, 2004). Ursächlich ist hier meist die Interaktion mit dem ER-Qualitätskontrollsystem (Hurtley and Helenius, 1989).

Auch LIMP-2, das in seiner murinen Variante über 11 potentielle N-Glykosylierungsstellen verfügt, ist anscheinend auf eine korrekte Glykosylierung seiner luminalen Domäne angewiesen (Barriocanal et al., 1986). Ob ein unterschiedlicher Einfluss einzelner Glykosylierungsstellen vorlag, ist bisher unbekannt.

5.1.2 Identifizierung der im murinen LIMP-2 Protein genutzten N-Glykosylierungsstellen

Im Zuge der Verifikation des LIMP-2 Strukturmodells wurde die Nutzung einzelner N-Glykosylierungsstellen untersucht. Mittels Deglykosylierungsexperimenten und *Western-Blot* Analysen konnte gezeigt werden, dass bis auf N122 und N430, alle weiteren N-Glykosylierungsstellen des murinen LIMP-2 Proteins genutzt wurden, d.h. sie lagen glykosyliert vor. Diese Daten stimmen mit aus Glykoproteom Studien gewonnenen Daten (Zhang et al., 2003 und Chen et al., 2009) für das humane LIMP-2 Protein überein. Die N-Glykosylierungsstellen von LIMP-2 sind speziesübergreifend nahezu vollständig konserviert. Eine Ausnahme bildet die N-Glykosylierungsstelle N122, die nur in 4 der 25 untersuchten Spezies auftritt. Sie ist zwar in der murinen Variante vorhanden in der humanen hingegen nicht. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, warum sie nicht genutzt wird. Die Ursache dafür könnte letztendlich eventuell in der Struktur von LIMP-2 in diesem Bereich liegen. Während bei der Fehlfaltung des Proteins im Falle der LIMP-2-11xNA_A122N Mutante dieser Bereich exponiert liegen und somit einer Glykosylierung zugänglich sein könnte, ist diese Zugänglichkeit im nativen Protein vermutlich nicht gegeben. So wies die humane LIMP-2 Variante mit der an Position N122 eingefügten N-Glykosylierungsstelle keinen Größenunterschied zum humanen Wildtyp Protein auf. Auch die murine N122Q Austausch-Variante zeigte diesbezüglich keinerlei Veränderung an.

Die Nichtnutzung von N430 lässt sich vermutlich mit der Nähe zur C-terminalen Transmembrandomäne erklären, durch die in einer Art „sterischen Hinderung“ die Glykosylierung verhindert wird.

Für die beiden mit LIMP-2 „verwandten“ Proteine SR-BI und CD36 wurden ebenfalls Glykosylierungsstudien durchgeführt. Während sich für das murine SR-BI eine Nutzung aller 11 potentiellen Stellen ergab (Viñals et al., 2002), waren im Falle von humanen CD36 ähnlich dem humanen LIMP-2 Protein 9 der 10 potentiellen Stellen glykosyliert (Hoosdally et al.,

2009). Der Abbildung 5.1-1 kann entnommen werden, dass die jeweiligen als „nicht genutzt“ identifizierten Stellen, in der Proteinfamilie nicht konserviert waren.

In Hinsicht auf das postulierte LIMP-2 Strukturmodell (Abbildung 4.1-1) zeigte die Analyse des Glykosylierungsstatus von LIMP-2, dass dieses Modell zu überdenken ist. So ist der proximal zur N-terminalen Transmembrandomäne gelegene Bereich mit der für die Strukturintegrität von LIMP-2 anscheinend notwendigen N-Glykosylierungsstelle N68 (siehe 5.1.3) nicht im Modell eingeschlossen. Zudem lässt sich die Nichtnutzung der N-Glykosylierungsstelle N122 anhand des Modells nicht erklären. So findet im nativen LIMP-2 Protein keine Glykosylierung an N122 statt, obwohl die Erkennungssequenz um das Asparagin N122 laut Strukturmodell gut zugänglich in einem Schleifenbereich des Proteins liegt. Weiterhin sind Bereiche der C-terminalen Transmembrandomäne noch im gefalteten Modell enthalten. Demnach könnte auch an N430 eine Glykosylierung erfolgen, die allerdings experimentell ausgeschlossen werden konnte.

5.1.3 Die herausragende Rolle der Glykosylierung von N68

Anhand der LIMP-2 Einzelaustausch-Varianten ließ sich zeigen, dass das Fehlen einzelner N-Glykosylierungsstellen toleriert wurde. Dies galt jedoch nicht für jede N-Glykosylierungsstelle. So war die Glykosylierung des Asparagins N68 zwingend notwendig für die korrekte Faltung von LIMP-2. Allerdings war die Glykosylierung dieses Asparagins alleine nicht hinreichend, wie die rER Fehllokalisation der LIMP-2-11xNA_A68N Variante trotz erfolgter Glykosylierung am re-inserierten Asparagin N68 zeigte. Bestätigt wurde dies durch eine LIMP-2 Variante (LIMP-2-5xNQ), in der neben den beiden als ungenutzt identifizierten N-Glykosylierungsstellen N122 und N430 drei weitere Glykosylierungsstellen (N45, N105 und N304) ausgetauscht waren. Während die 5xNQ Variante vollständig EndoH sensitiv und im rER lokalisiert war (Daten nicht gezeigt), wiesen die jeweiligen Einzelaustausch-Varianten (z.B. LIMP-2-N45Q) keinen Unterschied zum LIMP-2 Wildtyp Protein auf.

Auch für andere Proteine ist dieses Phänomen bekannt. So ist im Falle des Hämagglutinin Proteins (HA1) des Influenza Virus genau eine von sechs Glykosylierungen essentiell für die korrekte Faltung des Proteins (Hebert et al., 1997), während die übrigen fünf bei alleinigem Austausch die Faltung des Proteins nicht behindern. Wird mehr als eine einzelne dieser fünf Glykosylierungsstelle ausgetauscht, kommt es wiederum zur Fehlfaltung des Proteins (Daniels et al., 2003).

Normalerweise würde man davon ausgehen, dass besonders die sowohl Spezies übergreifenden als auch die zwischen den verschiedenen Mitgliedern der CD36 Superfamilie (LIMP-2, SR-BI und CD36) konservierten N-Glykosylierungsstellen eine ausschlaggebende Rolle bei der Faltung spielen sollten (siehe Abbildung 5.1-1). Dies ist jedoch nicht der Fall. Wie sich aus Abbildung 5.1-1 ablesen lässt, sind nur die N-Glykosylierungsstellen N206, N224 und N249 (Aminosäurennummerierung bezogen auf LIMP-2 Sequenz) in allen drei Proteinen sowohl in ihrer murinen als auch humanen Variante konserviert. Diese N-Glykosylierungsstellen waren aber nicht essentiell für die korrekte Faltung oder den Transport eines der Proteine. Während für SR-BI mit N108 und N173 zwei N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden konnten, die jeweils unabhängig voneinander notwendig für die korrekte Faltung und effiziente Plasmamembranlokalisation waren (Viñals et al., 2002), konnte für das humane CD36 Protein eine solche individuell notwendige Glykosylierungsstelle nicht gefunden werden (Hoosdally et al., 2009). Auffällig war, dass das Fehlen der zwischen SR-BI und LIMP-2 konservierte N-Glykosylierungsstelle N108 (SR-BI) bzw. N105 (LIMP-2) in LIMP-2 toleriert wurde. Eventuell ist hier nicht die direkte Position der N-Glykosylierungsstelle im Protein entscheidend, sondern die Reihenfolge der Glykosylierungen an sich. So handelt es sich bei den essentiellen N-Glykosylierungsstellen N68 in LIMP-2 und N108 in SR-BI jeweils um die zweite N-Glykosylierungsstelle innerhalb des Proteins. Warum dies aber bei CD36 für die zweite N-Glykosylierungsstelle (N102 bzw. N134) nicht zu traf, ist unklar (Hoosdally et al., 2009).

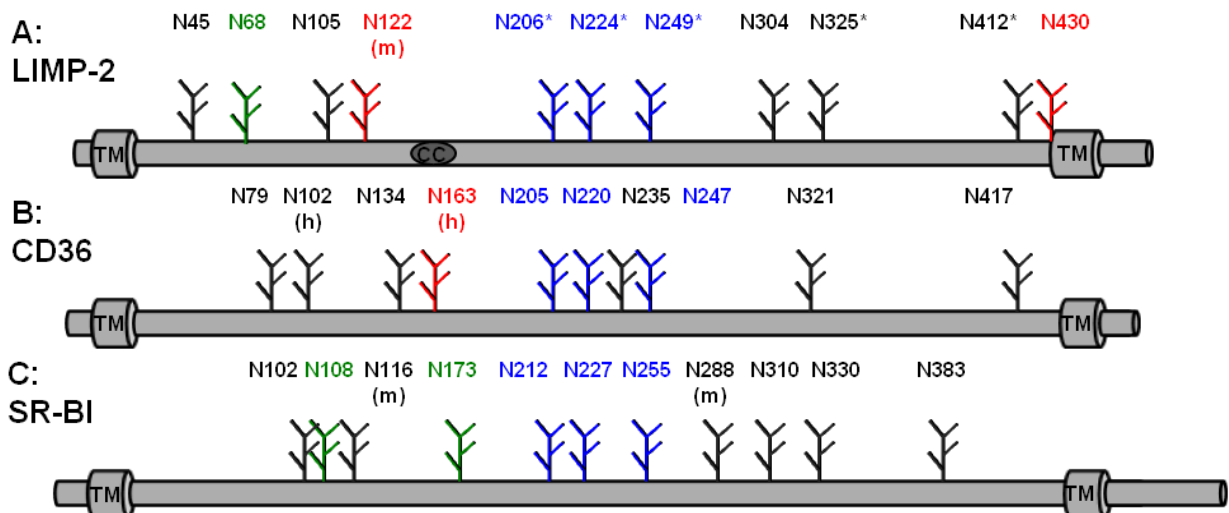


Abbildung 5.1-1: Schematische Darstellung der N-Glykosylierungsstellen innerhalb der CD-36 Protein-Superfamilie.

N-Glykosylierungsstellen der murinen und humanen Varianten von (A) LIMP-2, (B) CD36 und (C) SR-BI.

(h/m) = betreffende N-Glykosylierungsstelle kommt nur in der humanen/murinen Sequenz vor.

Rot: N-Glykosylierungsstelle wurde als nicht genutzt identifiziert.

Blau: In allen drei Proteinen konservierte N-Glykosylierungsstelle.

Grün: N-Glykosylierungsstelle ist für die Faltung des Proteins notwendig.

*: EndoH sensitive N-Glykosylierungsstelle.

5.1.4 Die Auswirkung der zusätzlichen potentiellen N-Glykosylierungsstelle H363N auf das humane LIMP-2 Protein

Nicht nur eine fehlende Glykosylierung kann vermutlich die Faltung eines Proteins beeinflussen, sondern auch eine zusätzliche (Weis and Drickamer, 1996). Die Analyse der AMRF hervorrufoenden Mutation H363N (Dardis et al., 2009) von LIMP-2 bestätigte dies (Blanz et al., 2010). Durch die Punktmutation c.1087C.A im SCARB2 Gen wird ein Austausch des innerhalb der CD36 Superfamilie hochkonservierten Histidins H363 in ein Asparagin verursacht. Dies führte zur Generierung einer weiteren potentiellen N-Glykosylierungsstelle, die in der Tat auch genutzt wird. Das Protein zeigte infolgedessen keinerlei lysosomale Lokalisation mehr, sondern verblieb im rER. Die Analyse weiterer Punktmutationen (T108N und Y388S), die hinsichtlich der Verifikation des Faltungsmodells der luminalen LIMP-2 Domäne generiert wurden und ebenso zu einer zusätzlichen potentiellen N-Glykosylierungsstelle in LIMP-2 führten, ergab, dass diese entweder nicht genutzt (Y388S) oder aber eine Nutzung nicht eindeutig war (T108N) (Daten nicht gezeigt). Während die T108N Variante weiterhin lysosomal lokalisiert war, verblieb die Y388S Mutante im rER.

Für CD36 oder SR-BI sind bisher keine Punktmutationen untersucht worden, die eine zusätzliche potentielle N-Glykosylierungsstelle generieren. Allerdings bewirken im CD36 Protein andere Punktmutationen (Rać et al., 2007) ebenfalls eine rER Retention der betreffenden CD36 Variante (Kashiwagi et al., 1995). Als ein Beispiel sei hier der Austausch des in der CD36 Familie konservierten Prolins P90 in ein Serin genannt (Kashiwagi et al., 1995). Die entsprechende Variante von LIMP-2 (P88S) ist ebenso im rER lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Andere Punktmutationen wiederum beeinflussen nicht die Faltung oder den Transport von z.B. CD36 aber dessen Funktion (Serghides et al., 1998). Somit ist festzuhalten, dass nicht nur die Aminosäuren, die für die korrekte Glykosylierung und den Transport von LIMP-2 verantwortlich sind, sondern auch weitere Aminosäurepositionen einen entscheidenden Charakter in Bezug auf Faltung, Lokalisation und Funktion von LIMP-2 haben können.

5.1.5 N-Glykosylierung von LIMP-2 und die Faltung des Proteins

Die aus der Analyse des Glykosylierungsstatus von LIMP-2 gewonnenen Daten unterstützen die Annahme, dass eine fehlende bzw. fehlerhafte Glykosylierung von LIMP-2 eher die Faltung des Proteins behindert, als seinen lysosomalen Transport oder die Stabilität im Lysosom, wie es von Barriocanal *et al.*, 1986 nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. So

ist für den lysosomalen Transport von LIMP-2 eher das C-terminale Di-Leucin/Isoleucin-Motiv (Ogata and Fukuda, 1994; Sandoval et al., 1994) in seinem Zusammenspiel mit dem Adaptorprotein AP3 verantwortlich (Höning et al., 1998). Kundra und Kornfeld konnten darüber hinaus feststellen, dass durch intrazelluläre EndoH Behandlung deglykosyliertes LIMP-2 im Gegensatz zu LAMP-1 und LAMP-2 keine erhöhte proteolytische Degradation im Lysosom erfährt (Kundra and Kornfeld, 1999). Sie schlossen daraus, dass die N-Glykosylierung von LIMP-2 für die initiale Faltung des Proteins essentiell sein müsste und nicht für die Stabilität (Kundra and Kornfeld, 1999).

Auch wenn das Verhalten von Glykoproteinen nach der enzymatischen Entfernung ihrer Kohlenhydratketten anscheinend nicht einheitlich ist, kann ein Großteil der Proteine ohne strukturelle Änderungen und funktionelle Einbußen mittels EndoH oder PNGaseF deglykosyliert werden (Helenius and Aebi, 2004). Dieser Umstand wird vor allem bei der Proteinkristallisation ausgenutzt, da die flexiblen Kohlenhydratketten die Formation gut beugender Kristalle oftmals behindert (Butters et al., 1999). Dazu wird das Glykoprotein vor seiner Kristallisation in der Regel mit EndoH deglykosyliert (Chang et al., 2007). Dadurch wird auch der schützende Effekt auf hydrophobe Proteinbereiche durch das verbliebene GlcNac Monosaccharid am Asparaginrest erhalten (Petrescu et al., 2004).

Eine mittels Röntgenstrukturanalyse gewonnene Proteinstruktur kann unter Umständen auch mit Hilfe der N-Glykosylierungsstellen überprüft werden. So lassen sich N-Glykosylierungen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit an Übergängen der Sekundärstruktur von Proteinen lokalisieren (Petrescu et al., 2004). Des Weiteren lassen sich auch durch die Nichtnutzung einer Glykosylierungsstelle Rückschlüsse auf die Struktur ziehen.

5.1.6 Partielle EndoH Sensitivität

Die für das native LIMP-2 beobachtete partielle EndoH Sensitivität stellt keine Exklusivität dar. Auch bei SR-BI ist dies beobachtet worden (Babitt et al., 1997, Viñals et al., 2002). Beachtenswert ist, dass die als EndoH sensitiv identifizierten N-Glykosylierungsstellen von LIMP-2 vor allem die hochkonservierten Asparagine betreffen (siehe Abbildung 5.1-1). Ein Zusammenhang zwischen der partiellen EndoH Sensitivität von LIMP-2 und der β -GC Bindung konnte nicht festgestellt werden. Die spezifische Bindung zwischen β -GC und LIMP-2 scheint somit eine reine Protein-Protein Interaktion zu sein im Gegensatz zur Kohlenhydrat-Protein basierenden Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand im Falle des M6P-Rezeptor abhängigen Transportes (Blanz et al., 2010). Ein Indiz für diese kohlenhydratunabhängige Interaktion von LIMP-2 und β -GC liefert die Beobachtung, dass

eine Veränderung der Glykosylierung keinen Einfluss auf die Bindung von β -GC und LIMP-2 hat (Reczek et al., 2007). Anscheinend beeinflusst die Glykosylierung zwar die Faltung des Proteins nicht aber seine Funktion und die Bindung an seinen Liganden, auch wenn sich diese schon im rER vollzieht (Reczek et al., 2007 und Blanz et al., 2010). Dies ist nicht ungewöhnlich (Mitra et al. 2006) und wurde ebenfalls für SR-BI (Viñals et al., 2002) und CD36 (Hoosdally et al., 2009) beschrieben. Die Gründe für die partielle EndoH Sensitivität sind bisher für alle drei Proteine unbekannt.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass nach der initialen Anheftung des universalen Kernoligosaccharids an das Asparagin der N-Glykosylierungsstelle durch die Faltung des Proteins, diese Glykosylierungsstelle sterisch und strukturell so maskiert wird, dass eine Maturierung im Golgi-Apparat nicht mehr erfolgt. Somit verbleibt diese Glykosylierung im EndoH sensitiven Status. Eventuell hängt die partielle EndoH Sensitivität aber auch mit einer Dimerisierung der Proteine zusammen. Diese wird im Allgemeinen im rER eingeleitet wird (Rose and Doms, 1988). Die Glykosylierungen wären in diesem Fall durch das jeweilig andere Molekül des Homodimers maskiert.

5.2 Untersuchung zur LIMP-2 Dimerisierung

Da sowohl für CD36 (Thorne et al., 1997) als auch für SR-BI (Reaven et al., 2004) eine Dimerisierung bzw. Oligomerisierung gezeigt werden konnte und für β -GC und LIMP-2 ein Komplex mit einer 2:2 Stöchiometrie postuliert wurde (Reczek et al., 2007), sollte eine potentielle Dimerisierung von LIMP-2 mit Hilfe verschiedener Ansätze untersucht werden. Gleichzeitig sollte die Interaktion von LIMP-2 mit β -GC näher charakterisiert werden. Mit Hilfe der Photo-reaktiven Aminosäuren (Suchanek et al., 2005) konnte eine Homo-Dimer- bzw. Oligomerausbildung von LIMP-2 sowohl endogen als auch verstärkt nach Überexpression nachgewiesen werden. Für β -GC konnte dies nur in Überexpressionsexperimenten beobachtet werden. Auch wenn β -GC in einer Raumgruppe mit 2 Molekülen pro asymmetrischer Einheit kristallisiert (Dvir et al., 2003 und Lieberman 2011), konnte die Existenz einer dimeren Konformation des Enzyms bisher nicht bestätigt werden. Die beobachteten β -GC Dimere bzw. Oligomere könnten demnach ein Resultat der Überexpression und der erhöhten Anzahl an β -GC Molekülen in der Zelle und vor allem im rER sein.

Eine heterologe Verknüpfung von LIMP-2 und β -GC konnte nicht über die Photo-Aminosäuren erzielt werden. Anscheinend ist entweder der Abstand zwischen den Proteinen zu groß, oder aber im Interaktionsinterface ist kein Leucin oder Methionin enthalten. Grundsätzlich ist aber eine heterologe Verknüpfung zweier Proteine mit dieser *Crosslink* Technik möglich (Suchanek et al., 2005).

Als Dimerisierungsdomäne konnte das *coiled-coil* Domäne von LIMP-2 ausgeschlossen werden. Auch wenn solche Domänen normalerweise durch Ausbildung von *supercoils* zu einer homo- oder heterologen Dimerisierung bzw. Oligomerisierungen von Interaktionspartnern führen (Cohen and Parry, 1994), dient die LIMP-2 *coiled-coil* Domäne anscheinend nur der Bindung der β -GC (Reczek et al., 2007 und Blanz et al., 2010). Dafür spricht auch, dass die Interaktion von LIMP-2 und β -GC schon im rER stattfindet (Reczek et al., 2007 und Blanz et al., 2010) und somit parallel zu einer möglichen Dimer- bzw. Oligomerisierung von LIMP-2.

Für die Eingrenzung der Dimerisierungsdomäne von LIMP-2 war der gewählte Ansatz des Methionin-Screens nicht erfolgreich. Offensichtlich führte die luminale Demethioninierung von LIMP-2 zur Fehlfaltung des Proteins, die auch nicht durch die Re-inserierung eines einzelnen Methionins behoben werden konnte. Die Fehlfaltung und die damit verbundene strukturelle Instabilität könnte somit zur artifiziellen Dimerausbildung geführt haben. Eine gesicherte Identifizierung einer Dimerisierungsdomäne ist somit an die korrekte Faltung und

Lokalisation des untersuchten Proteins gebunden. Dies war für die LIMP-2 Methionin-Varianten nicht der Fall.

Dagegen wurde für SR-BI ein auf Glycinen basierendes Dimerisierungsmotiv ($G^{15}X_2G^{18}X_3AX_2G^{25}$) in der N-terminalen Transmembrandomäne identifiziert (Gaidukov et al., 2011). Dieses Motiv wird als notwendig für die Ausbildung von SR-BI Homo-Dimeren und Oligomeren über dessen Interaktion mit der N- oder C-terminalen Transmembrandomäne benachbarter SR-BI Moleküle erachtet, die in verschiedenen Zelllinien und Geweben u.a. durch Ko-Immunpräzipitationen, FPLC und Dichtegradienten-Zentrifugation beobachtet werden konnte (Reaven et al., 2004; Reaven et al., 2006; Connelly and Williams, 2004 und Sahoo et al., 2007 (a)). Zuvor wurde aufgrund der aus FRET-Studien gewonnenen Ergebnisse die C-terminale zytoplasmatische Domäne favorisiert, eine genaue Identifizierung eines möglichen darin enthaltenen Motivs gelang aber nicht (Sahoo et al., 2007 (b)), so dass das in CD36 und SR-BI konservierte Glycin Motiv ausschlaggebend zu sein scheint (Gaidukov et al., 2011). In der N-terminalen Transmembrandomäne von LIMP-2 ist dieses Motiv nicht enthalten. Es müssen also andere Motive/Domänen für die Dimerisierung verantwortlich sein. In Hinblick auf die funktionelle Bedeutung einer Dimerisierung von LIMP-2 ist zu bemerken, dass weder die korrekte Plasmamembranlokalisation noch die HDL-Bindungsfunktion von SR-BI an eine Dimerisierung gekoppelt sind, die selektive Lipidaufnahme hingegen schon (Gaidukov et al., 2011).

5.2.1 Eine LIMP-2 Dimerisierung über Disulfidbrücken ist artifizieller Natur

Für CD36 wurde ebenfalls eine dimere Konformation beschrieben, auch wenn die Literaturlage in diesem Punkt widersprüchlich ist.

Auf der einen Seite wurde in Insektenzellen als rekombinantes Membranprotein produziertes CD36 mittels analytischer Ultrazentrifugation als funktionales Monomer beschrieben (Martin et al., 2007). Auch für die rekombinante CD36 Ectodomäne wurde mittels SEC eine monomere Konformation bestätigt (Jimenez-Dalmaroni et al., 2009). Auf der anderen Seite zeigten Studien, dass CD36 auch Homo-Dimere und Oligomere ausbildet (Daviet et al., 1997 und Thorne et al., 1997). Während allerdings bei Daviet *et al.* die Dimerisierung eines ansonsten monomer vorliegenden CD36 Moleküls durch die Bindung von Thrombospondin-1 induziert werden kann (Daviet et al., 1997), weist laut Thorne *et al.* CD36 *in vivo* eine auf die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken zurückzuführende Dimerkonformation auf (Thorne et al., 1997). Innerhalb der extrazellulären Domäne von CD36 sind 6 Cysteine

geclustert lokalisiert (Silverstein and Febbraio 2009). Von diesen sind 5 innerhalb der CD36 Proteinfamilie konserviert. Eine Untersuchung der einzelnen Cysteinreste zur Klärung welche von ihnen in der Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücken involviert sind, fand jedoch nicht statt (Thorne et al., 1997). Für bovines CD36 wurde gezeigt, dass die 6 Cysteine drei intramolekulare Disulfidbrücken (C242-C310, C271-C333 und C312-C321) ausbilden (Rasmussen et al., 1998). Eine Unterscheidung, ob es sich wirklich um intramolekulare und nicht um intermolekulare Disulfidbrücken handeln könnte, war mit den verwendeten Analysenmethode nicht möglich (Martin et al., 2007). Für SR-BI ist hingegen mittels Massenspektroskopie das Vorhandensein von zwei freien Cysteinen im exoplasmatischen *Loop* gesichert (Yu et al., 2011). Dies ist insofern konform mit den Daten für CD36, als nur fünf der sechs Cysteine von SR-BI auch in CD36 konserviert vorliegen. So verwundert es auch nicht, dass das nicht konservierte Cystein eines der freien Cysteine ist. Die beiden Disulfidbrücken wurden als intramolekular identifiziert (Yu et al., 2011). In einer weiteren Publikation wird allerdings das Vorliegen von drei intramolekularen Disulfidbrücken berichtet, so dass in der exoplasmatischen SR-BI Domäne keine freien Cysteine vorhanden sind (Papale et al., 2011).

Im Falle von CD36 ist die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken vergleichbar der N-Glykosylierung notwendig für die einwandfreie Faltung und den Weitertransport des Proteins aus dem rER (Gruarin et al., 2000), wie es auch im Allgemeinen gültig ist (Braakman et al., 1992 und Mamathambika and Bardwell, 2008).

Da für LIMP-2 unter nicht reduzierenden Bedingungen im *Western-Blot* ein vergleichbares Bandenmuster mit höher molekularen Signalen auftrat wie nach Durchführung des Photo-Aminosäuren *Crosslinks*, wurde überprüft, ob und wenn ja welche Cysteine dafür verantwortlich sein könnten. Da innerhalb der luminalen Domäne von LIMP-2 fünf Cysteine lokalisiert sind und unter obiger Annahme, dass sich intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden, wäre ein freies Cystein übrig. Dies könnte nun eine intermolekulare Disulfidbrücke mit einem benachbarten LIMP-2 Molekül ausbilden. Mit Hilfe von LIMP-2 Varianten, denen jeweils eines der luminalen Cysteine fehlte, sollte das dafür verantwortliche identifiziert werden. Es stellte sich allerdings heraus, dass keines der fünf Cysteine verantwortlich zu sein schien und auch eine LIMP-2 Variante, bei der alle fünf luminalen Cysteine gegen Serine ausgetauscht waren (mLIMP-2-5xCS), zeigte unter nicht reduzierenden Bedingungen die höher molekularen Banden. Eine mögliche Erklärung dieses ansonsten nur schwer verständlichen Phänomens könnte die Ausbildung artifizieller Disulfidbrücken über die zytosolisch lokalisierten Cysteine sein. So sind zwar in der LIMP-2-5xCS Variante alle

luminalen Cysteine ausgetauscht, nicht aber die drei zytosolischen, von denen zwei N-terminal und eines C-terminal lokalisiert sind. Normalerweise erfolgt keine Ausbildung von Disulfidbrücken im reduzierenden Milieu des Zytosols (Thornton, 1981 und Gilbert, 1990). Auch wenn Berichte über das Vorliegen von zytosolischen Disulfidbrücken in Proteinen in der Literatur zu finden sind (z.B. Odani et al., 2000), wäre im Falle von LIMP-2, bedingt durch die Überexpression im Zusammenspiel mit der Oxidierung freier Cysteine während der Probenaufbereitung (Ziegler, 1985), eher von einem Artefakt auszugehen. Dies wurde bereits für das lysosomale Transmembran Protein 192 (TMEM192) diskutiert, bei dem ein zytosolisches Cystein für die Ausbildung eines Homodimers verantwortlich ist (Behnke et al., 2011). Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass für endogenes LIMP-2 keine so stark ausgeprägte Dimer-/Oligomerausbildung unter nicht reduzierenden Bedingungen gezeigt werden konnte.

Ob innerhalb der luminalen Domäne von LIMP-2 ebenfalls intramolekulare Disulfidbrücken auftreten oder nicht, muss zukünftig noch geklärt werden. Ebenso sollte der Einfluss einzelner Cysteinreste analysiert werden. Auch wenn die Einzelaustausch-Varianten scheinbar keine Auswirkungen in irgendeiner Form auf LIMP-2 haben, weisen Studien in SR-BI und CD36 auf die funktionelle und strukturelle Bedeutung der Cysteine hin (Gruarin et al., 2000; Yu et al., 2011 und Hu et al., 2011). Der Einfluss der Cysteine auf die Homodimerisierung von SR-BI scheint dabei nicht eindeutig geklärt zu sein. Während bei Yu *et al.* z.B. das Cystein C384 in keinem Zusammenhang mit der Formation eines SR-BI Dimers steht, weisen die Ergebnisse von Hu *et al.* auf einen solchen hin.

Fest steht allerdings, dass LIMP-2 in irgendeiner Form von seinen Cysteinen „abhängig“ ist, da die LIMP-2 Variante ohne jegliche luminalen Cysteine im rER verbleibt (Daten nicht gezeigt).

5.2.2 Homologe LIMP-2 Verknüpfung mit DSS

Während für SR-BI eine homologe Verknüpfung in Abhängigkeit des Glycin-Motivs über BS³ möglich war (Gaidukov et al., 2011 und Yu et al., 2011), konnte LIMP-2 mit DSS, dem membrangängigen BS³ Analogon, nicht homolog miteinander verknüpft werden, sondern nur heterolog mit β -GC. Erst bei einer β -GC Defizienz konnte ein LIMP-2 Dimer detektiert werden. Offensichtlich spielte die Länge des jeweilig benutzten *Crosslinkers* eine Rolle. Sie darf nicht zu lang oder zu kurz sein. Eine homologe Verknüpfung von LIMP-2 war zwar mit den Photo-Aminosäuren, die einen Abstand von etwa 1,5 Å überbrückten, möglich, die Verknüpfung mit β -GC war aber erst mit DSS und einer Reichweite von etwa 11,5 Å

gegeben. Zu beachten ist, dass DSS nur mit Aminosäuren reagiert die in ihrer Seitenkette eine freie Amin-Gruppe tragen wie z.B. Lysin. So könnte durch das nicht Vorhandensein der β -GC ein ebensolches Lysin für eine homologe Verknüpfung freigelegt sein. Als mögliche Kandidaten kommen z.B. die beiden Lysine innerhalb der *coiled-coil* Domäne in Frage. Weitere Mutationsexperimente könnten Klarheit darüber bringen.

Die Ergebnisse aus den Dimerisierungsexperimenten deuten in ihrer Summe daraufhin, dass LIMP-2 Homo-Dimere ausbilden kann. Die Interaktion von LIMP-2 mit β -GC erfolgt im Verhältnis 1:1, so dass für den nativen Komplex aus LIMP-2 und β -GC eine 2:2 Stöchiometrie angenommen werden kann (Abbildung 5.2-1), auch wenn es bisher noch nicht möglich war, z.B. durch native Gelelektrophorese (*BlueNativ PAGE*) diesen Komplex auch nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

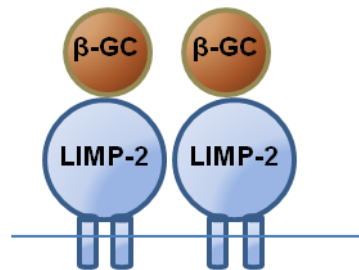


Abbildung 5.2-1: Schematische Darstellung des LIMP-2 / β -GC Komplex.

Die Interaktion von β -GC und LIMP-2 erfolgt im Verhältnis 1:1. Mit der für LIMP-2 gezeigten Dimerisierung ergibt dies somit einen LIMP-2 / β -GC Komplex mit einer 2:2 Stöchiometrie.

5.3 Rekombinante Expression der luminalen LIMP-2 Domäne

Um die strukturelle Natur von LIMP-2 und vor allem auch die Konformation des Proteins weiter zu analysieren, wurde die luminalen LIMP-2 Domäne als rekombinantes Protein hergestellt.

Ein erster Versuch im *E.coli* Expressionssystem war allerdings nicht erfolgreich. Es konnte zwar Protein produziert und aus den *Inclusion Bodies* gereinigt werden, doch misslang die Rückfaltung des Proteins. Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen erfolgt in prokaryotischen Zellen in der Regel keine Glykosylierung der exprimierten Proteine. Wie aus der Analyse des LIMP-2 Glykosylierungsstatus jedoch deutlich wurde, ist LIMP-2 auf seine Glykosylierungen hinsichtlich einer korrekten Faltung angewiesen. Dies könnte einer der Gründe sein, warum die Rückfaltung der im *E.coli*-Expressionssystem rekombinant hergestellten luminalen LIMP-2 Domäne fehlschlug. Eine weitere Ursache könnte das LIMP-2 Konstrukt an sich gewesen sein. Da es bei der Expression dieses Konstrukts auch darum ging das Faltungsmodell durch eine sich anschließende Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse zu verifizieren, wurde die diesem Modell entsprechende LIMP-2 Aminosäuresequenz gewählt (hLIMP-2-R77-Y440). Wie bereits erwähnt, fehlten dieser LIMP-2 Variante N-terminal etwa

45 luminale Aminosäuren. Des Weiteren lag auch der Anfang der potentiellen C-terminalen Transmembrandomäne innerhalb der gefalteten Modellstruktur, so dass nicht ausgeschlossen werden konnte, dass dadurch die strukturelle Integrität des Proteins beeinflusst wurde.

Daher wurde als weiteres Expressionssystem ein eukaryotisches Zellsystem verwendet. In der Regel wird allerdings ein Kristallisationsprozess durch die komplexen Kohlenhydratstrukturen des nativen Proteins gestört oder aber die Beugung der erhaltenen Proteinkristalle ist schlecht auflösend (Butters et al., 1999). Daher wird im Rahmen der Probenvorbereitung das entsprechende Protein enzymatisch deglykosyliert. Es wurde jedoch beobachtet, dass eine vollständige Deglykosylierung meist die Stabilität der Proteine reduziert (Stanley, 1989). Geeigneter ist es, wenn sich ein durch die Deglykosylierung mit EndoH ergebender GlcNAc Rest am Protein verbleibt (Davis et al., 1995; Petrescu et al., 2004 und Chang et al., 2007). Allerdings darf keine komplexe Glykosylierung des Proteins erfolgen, da diese nicht mittels EndoH entfernt werden kann. Erreicht wird eine homogene EndoH sensitive Glykosylierung entweder durch die Verwendung entsprechend modifizierter Zelllinien wie CHO Lec3.2.8.1 oder aber durch den Zusatz des Mannosidase I Inhibitors Kifunensin (Elbein et al., 1990) zum Zellkulturmedium.

CHO Lec3.2.8.1 Zellen wurden schon erfolgreich für die Expression der luminalen Domäne des lysosomal assoziierten Membranproteins LAMP-3d verwendet (Wilke et al., 2010). Deswegen sollte die luminale LIMP-2 Domäne (hLIMP-2-A32-E420) ebenfalls in diesem Zellsystem exprimiert werden, doch die Generierung einer stabilen Zelllinie schlug fehl.

Dagegen war die transiente Expression dieser Domäne in der Suspensionszelllinie HEK293-6E (Cachianes et al., 1993) unter Kifunensin Behandlung erfolgreich und die luminale LIMP-2 Domäne konnte aus dem Zellkulturüberstand gereinigt werden.

Die Expression der luminalen LIMP-2 Domäne als sekretorisches Protein führte zur Ko-Sekretion der endogenen β -GC. Die Bindung beider Proteine zueinander überstand dabei auch die Reinigungsstufen wie die Affinitäts- und die Größenausschlusschromatographie.

Bisher war eine solche Ko-Sekretion nur bei gleichzeitiger Ko-Expression von muriner β -GC und der murinen luminalen LIMP-2 Domäne in COS-7 Zellen beschrieben worden (Reczek et al., 2007). Eine Ko-Sekretion endogener β -GC konnte jedoch nicht gezeigt werden (Reczek et al., 2007). Dies mag vielleicht daran gelegen haben, dass der eingesetzte anti- β -GC Antikörper nur die murine β -GC Variante detektieren kann und somit nicht die endogene β -GC der COS-7 Zellen.

Der gereinigte LIMP-2 / β -GC Komplex war in sich nicht homogen. In der SEC konnten drei verschiedene Populationen separiert werden, von denen keine dem monomeren LIMP-2

Protein entsprach. Vielmehr waren in allen drei Fraktionen sowohl die luminalen LIMP-2 Domäne als auch β -GC nachzuweisen. Die Population mit dem geringsten Molekulargewicht (hier *Peak 3*), die anteilmäßig die kleinste der drei SEC-Fractionen darstellt, entsprach dabei einem LIMP-2 / β -GC Komplex mit einem 1:1 Verhältnis. Durch Ko-Expression von der luminalen LIMP-2 Domäne und β -GC sollte der Anteil dieser Fraktion vergrößert werden. In der Tat konnte dadurch der Anteil dieser Fraktion an der Gesamtheit vergrößert werden (vgl. *Peak 4* in Abbildung 4.3-12). Dennoch traten drei Populationen mit einem höheren apparenten Molekulargewicht auf, das auf ein Vorliegen größerer Komplexe schließen ließ (*Peak 1* bis *3* in Abbildung 4.3-12). In den *Peaks 1* bis *3* konnte das Vorliegen von über Disulfidbrücken verbundenen Proteinkomplexen durch *Western-Blot* und Coomassie-Gel Analysen unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen gezeigt werden. Im Falle des *Peak 4* traten hingegen sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen nur monomere Signale für LIMP-2 und β -GC auf. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Interaktion zwischen der luminalen LIMP-2 Domäne und β -GC nicht auf der Ausbildung von Disulfidbrücken beruht. Hinzukommt, dass LIMP-2 in den *Peaks 3* bis *1* einen höheren Vernetzungsgrad erreicht und so im *Peak 1* letztendlich nicht mehr als Monomer detektiert werden kann, während β -GC in allen Fraktionen auch zum Teil als Monomer unter nicht reduzierenden Bedingungen enthalten ist. Wie schon bei der Diskussion der LIMP-2 Dimerbildung über Cysteine (siehe 5.2.1), muss daher wieder davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beobachteten Disulfidverbrückungen um ein Artefakt durch Überexpression und oxidative Bedingungen handeln könnte. Somit ist *Peak 4* vermutlich der korrekte native Komplex ohne artifizielle Disulfidbrücken.

Mittels Massenspektroskopie konnte des Weiteren gezeigt werden, dass zwar auch andere Proteine in den Gelbanden des Coomassie-Gels identifiziert werden konnten, es sich dabei aber eher um Verunreinigungen durch die Präparation wie z.B. Kreatin handelte. Der Großteil der in den Gelbanden identifizierten Peptidfragmente konnte jedoch LIMP-2 und β -GC zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt), so dass davon ausgegangen werden darf, dass alle im Coomassie-Gel beobachteten Signale ausschließlich auf LIMP-2 und β -GC basieren.

Eine kovalente Verknüpfung von endogener β -GC und der luminalen LIMP-2 Domäne gelang durch die Behandlung der SEC-Fraktion der alleinigen rekombinanten LIMP-2 Expression mit BS³, dem hydrophilen Sulfoanalog zu DSS. Somit konnten die Daten des endogenen Crosslinks mit DSS bestätigt werden.

Während rekombinante β -GC (Imiglucerase, Handelsname Cerezyme® 400U; Genzyme GmbH, Neu-Isenburg) in der SEC als Monomer lief, konnte das Enzym durch BS³

Behandlung teilweise in eine dimere Konformation überführt werden. Aufgrund der sehr niedrigen β -GC Proteinlevel in LIMP-2 defizienten Zellen konnte dies bei der endogenen DSS Behandlung nicht erkannt werden. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass LIMP-2 und β -GC bei gleichzeitigem Vorliegen kovalent über DSS bzw. BS³ miteinander verbunden werden können. Fehlt nun aber der Interaktionspartner kommt es zur Homodimer Verknüpfung durch den Crosslinker, wobei unter Umständen die dazu benötigten Lysine eigentlich in der Interaktionsdomäne der beiden Proteine liegen. Dies sollte in zukünftigen Experimenten überprüft werden und könnte dabei auch zur genauen Lokalisierung der Interaktionsdomäne dienen.

Das aus beiden Expressionsexperimenten gewonnene Material ist auf Grund seiner Heterogenität und dem Vorliegen der Disulfidartefakte eher ungeeignet für ein Kristallisationsexperiment. Für zukünftige Experimente sollte daher ein anderes Expressionssystem gewählt werden. Eine Möglichkeit stellte die Expression in Insektenzellen unter Nutzung eines Baculovirussystems dar (Nettelship et al., 2010).

Da die N-Glykosylierungsstellen von Säugetierproteinen auch von Insektenzellen erkannt werden, findet eine korrekte *Core*-Glykosylierung der jeweiligen Proteine statt (Jarvis 2003). Dies und die Abwesenheit der β -GC macht die Insektenzellen zu einem geeigneten Expressionssystem, um LIMP-2 bzw. die luminale LIMP-2 Domäne als rekombinantes Protein zu produzieren. Dies könnte dann als Ausgangsmaterial für ebensolche Kristallisationsexperimente dienen.

Sowohl CD36 als vollständiges Transmembranprotein (Hoosdally et al., 2009 und Martin et al., 2007) als auch nur die extrazelluläre CD36 Domäne (Jimenez-Dalmaroni et al., 2009) wurden in einem solchen Insektenzell-Expressionssystem rekombinant hergestellt.

Die CD36 Ektodomäne wurde dabei als monomeres Glykoprotein mit Anzeichen für α -helikale als auch für β -Faltblatt Sekundärstrukturanteile aus dem Zellkulturüberstand gewonnen (Jimenez-Dalmaroni et al., 2009). Bisher ist aber noch keine Kristallstruktur von CD36 publiziert worden.

Die luminale LIMP-2 Domäne wurde ebenfalls schon einmal in Insektenzellen exprimiert (Reczek et al., 2007). Es wurde allerdings keine Charakterisierung der Domäne durchgeführt und bisher auch keine Kristallstruktur veröffentlicht.

5.4 Die LIMP-2 coiled-coil Domäne als synthetisches Peptid

Ko-Präzipitationsexperimente mit β -GC und AMRF-Mutanten, die zur Expression C-terminal trunkierter LIMP-2 Varianten führen, zeigten, dass der Bereich zwischen den Aminosäuren 145 und 288 der luminalen LIMP-2 Domäne notwendig für die Interaktion mit β -GC ist (Blanz et al., 2010). Innerhalb dieses Bereiches liegt das *coiled-coil* Motiv (Aminosäure 152 bis 167), das schon zuvor als notwendig für eine Interaktion der beiden Proteine erachtet wurde (Reczek et al., 2007).

Während bisher nur die α -helikale Sekundärstruktur dieses *coiled-coil* Motives bestätigt wurde (Blanz et al., 2010), konnte hier zum ersten Mal die Struktur dieser LIMP-2 Domäne mittels NMR Spektroskopie aufgeklärt werden. Diese Struktur könnte z.B. bei Kenntnis der Interaktionsdomäne auf Seite des β -GC Moleküls genutzt werden, um *in silico* Docking-Experimente durchzuführen, wie sie auch schon für β -GC und seinen Kofaktor Saposin C belegt sind (Atrian et al., 2008 und Lieberman 2011). So ließen sich eventuell auch weitere Einblicke in das Zusammenspiel von LIMP-2 und β -GC gewinnen.

Während das zuvor zur Charakterisierung genutzte *coiled-coil* Peptid eine dimere Konformation mit einer pH-Wert abhängigen Oligomerisierung aufwies (Blanz et al., 2010), sprachen die in dieser Arbeit generierten NMR und SEC Daten eher für eine monomere Konformation des Peptides. Auf eine Oligomerisierung bzw. Tetramerisierung der Domäne wies allerdings wiederum die SEC-Analyse des mit einem Biotin-Tag am N-Terminus versehenen Peptids hin. Die beobachtete Größenzunahme kann aber auch artifizieller Natur sein und auf einem Matrixeffekt beruhen, der durch eine Wechselwirkung des Säulenmaterials mit dem Biotin-Tag bzw. mit dem verwendeten Ttds-Linker (siehe 3.1.9) hervorgerufen wurde. Des Weiteren könnte auch der hydrodynamische Radius des Peptids bei korrekter Sekundärstrukturausbildung durch den Linker und das Biotin-Tag so verändert sein, dass dies sein Laufverhalten in der SEC verfälscht und wesentlich vom Laufverhalten der globulären Standardproteine abweichen ließ. In beiden Fällen würde dies zu einer Überschätzung der relativen Molekülmasse führen. Eine solche Überschätzung aufgrund der Proteinstruktur ist für Glycocalicin beschrieben (Skinner et al., 1991).

Mittels Präzipitationsversuchen mit dem biotinylierten Peptid konnte gezeigt werden, dass die *coiled-coil* Domäne alleine ausreicht um β -GC zu binden und zu präzipitieren. Da aber keine vollständige Präzipitation der eingesetzten β -GC Menge zu beobachten war, liegt der Verdacht nahe, dass auch andere Bereiche von LIMP-2 an der Interaktion mit β -GC teilnehmen und diese beeinflussen. Eine pH-Wert abhängige Interaktion von LIMP-2 und β -GC wie von Reczek *et al.*, postuliert, konnte für das biotinylierte Peptid nicht bestätigt

werden. Auch die Analyse des *Peak 4* (siehe 4.3.3.1), in dem β -GC und das luminale LIMP-2 nicht über Disulfidbrücken verknüpft sind, in der SEC unter pH 5 Pufferbedingungen führte zu keiner Aufspaltung des *Peaks* in ein β -GC Monomer und Monomer der luminalen LIMP-2 Domäne (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren sollten als Kontrollexperiment und zur Analyse der Interaktion zwischen LIMP-2 und β -GC Experimente mit einem anderem *coiled-coil* Peptid durchgeführt werden, um zu überprüfen ob es auf die Struktur an sich oder aber auf die spezielle Sequenz der LIMP-2 *coiled-coil* Domäne bei der Interaktion ankommt. Als Negativkontrolle könnte dabei ein Peptid der Triple D LIMP-2 Variante dienen. Durch den Austausch der drei hydrophoben Aminosäuren (L155, I156 und L160) durch hydrophile Aspartate wurde bei dieser LIMP-2 Variante zwar die α -helikale Struktur erhalten, aber nicht die *coiled-coil* Domänen Eigenschaften. Dies resultierte in einer reduzierten Interaktion mit β -GC (Blanz et al., 2010).

Mit Hilfe des biotinylierten LIMP-2 *coiled-coil* Peptids könnten darüber hinaus Bindungsaffinitäten mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie bestimmt und nach weiteren Interaktionspartnern gesucht werden. Darüber hinaus eröffnen sich völlig neue Perspektiven und Einsatzmöglichkeiten durch die Erkenntnis, dass sich die Enzymaktivität durch Zugabe des biotinylierten Peptids erhöhen ließ. Dabei sollte aber nicht außer Acht gelassen werden, dass bisher noch nicht ausgeschlossen werden konnte, ob nicht auch der Ttds-Linker oder aber das Biotin-Tag für die beobachtete enzymatische Steigerung der rekombinanten β -GC verantwortlich ist.

Auch für andere Substanzen wurde ein aktivitätssteigernder Effekt belegt und ein therapeutischer Nutzen dieser chemischen / pharmakologischen Chaperone diskutiert. Bei den meisten dieser Substanzen handelt es sich eigentlich um Inhibitoren der β -GC, die aber durch ihre Bindung unter anderem an das aktive Zentrum von β -GC eine auf Mutationen basierende Fehlfaltung verhindern können (Valenzano et al., 2011). Andere Substanzen wirken dagegen direkt als Aktivatoren der β -GC (Goldin et al., 2012).

Letztendlich wäre auch eine Ko-Kristallisation des LIMP-2 *coiled-coil* Peptids zusammen mit der rekombinanten β -GC erstrebenswert, um eventuell dadurch die Bindung von LIMP-2 und β -GC besser verstehen zu können. Vergleichbare Ko-Kristallisationen und Röntgenstrukturanalysen wurden bereits erfolgreich mit β -GC Inhibitoren durchgeführt (Lieberman 2011).

6 Zusammenfassung

Das lysosomale integrale Membranprotein Typ 2 (LIMP-2) wurde kürzlich als Transportrezeptor der lysosomalen Hydrolase β -Glucocerebrosidase (β -GC) identifiziert.

Der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion von LIMP-2 sowie die Interaktion mit β -GC ist bisher allerdings nicht näher untersucht worden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher den Einfluss der Glykosylierung auf Faltung, Strukturintegrität und Transport des LIMP-2 Proteins zu analysieren. Dies sollte erste Informationen hinsichtlich der LIMP-2 Struktur liefern.

Verschiedene biochemische Methoden wie Mutagenese-Studien, Deglykosylierungs-experimente mit PNGaseF und EndoH sowie deren Auswertung mittels *Western-Blot* Techniken wurden dazu verwendet, um die Bedeutung einzelner potentieller N-Glykosylierungsstellen offenzulegen. Die lysosomale Lokalisation der entsprechenden LIMP-2 Glykosylierungsvarianten wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass neun der elf potentiellen N-Glykosylierungsstellen von LIMP-2 glykosyliert vorliegen. Sowohl die nicht konservierte N-Glykosylierungsstelle N122 als auch die unmittelbar vor der C-terminalen Transmembrandomäne gelegene N-Glykosylierungsstelle N430 werden nicht genutzt. Das LIMP-2 Protein selbst ist auf eine korrekte N-Glykosylierung angewiesen. Insbesondere eine Glykosylierung des Asparagins N68 ist essentiell, alleine aber nicht hinreichend.

Der Glykosylierungsstatus von LIMP-2 und die beobachtete EndoH Sensitivität einzelner N-Glykosylierungsstellen stehen in keinem Zusammenhang mit der β -GC Interaktion.

In weiteren Experimenten, unter anderem in *Crosslink*-Studien, konnte die Ausbildung eines LIMP-2 Homo-Dimers nachgewiesen werden. Weiterhin konnte für die Interaktion von LIMP-2 und β -GC ein 1:1 Verhältnis gezeigt werden.

Die Überexpression der luminalen LIMP-2 Domäne als Sekretionsprotein in HEK-6E Zellen führte zur Ko-Sekretion endogener und ko-exprimierter β -GC. Neben einem nativen LIMP-2 / β -GC Komplex konnten zum Großteil nur artifiziell verknüpfte LIMP-2 / β -GC Komplexe gereinigt werden. Die Bedeutung der *coiled-coil* Domäne von LIMP-2 für die Vermittlung der β -GC Interaktion konnte durch die Präzipitation rekombinanter β -GC durch ein isoliertes LIMP-2 *coiled-coil* Peptid bestätigt werden. Abschließend konnte auch die Tertiärstruktur des *coiled-coil* Motives aufgeklärt werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse stellen somit die Grundlage für zukünftige Strukturanalysen dar, die dann zur vollständigen LIMP-2 Strukturaufklärung führen könnten.

7 Summary

The lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) has recently been identified as a transport receptor of the lysosomal hydrolase β -glucocerebrosidase (β -GC).

The relationship between structure and function of LIMP-2 as well as the interaction with of LIMP-2 with β -GC has not yet been investigated in detail.

The goal of this study was to analyze the influence of glycosylation on folding, the structural integrity and trafficking of the LIMP-2 protein. This should provide preliminary information regarding the structure of LIMP-2.

Several biochemical approaches such as mutagenesis studies, deglycosylation assays with PNGaseF and EndoH and their subsequent analysis by Western blot techniques were used to reveal the importance of individual potential N-glycosylation sites. The lysosomal localization of the corresponding LIMP-2 glycosylation variants was analyzed by indirect immunofluorescence.

It was shown that nine of the eleven potential N-glycosylation sites of LIMP-2 are glycosylated. Both the non-conserved N-glycosylation site N122 and the immediately prior to the C-terminal transmembrane domain located N-glycosylation site N430 are not modified by glycosylation. The LIMP-2 protein itself is dependent on correct N-glycosylation. In particular, glycosylation of asparagine N68 is essential but does not suffice on its own.

The glycosylation status of LIMP-2 and the observed EndoH sensitivity of individual N-glycosylation sites are apparently not associated with β -GC interaction.

In further experiments, including cross-link studies, the formation of a LIMP-2 homodimer was identified. Furthermore the interaction of LIMP-2 and β GC was found to be present in a 1:1 ratio.

Over-expression of the luminal LIMP-2 domain as a secretory protein in HEK-6E cells led to co-secretion of endogenous and co-expressed β -GC. Apart from a native LIMP-2/ β -GC complex, mainly artificially linked LIMP-2/ β -GC complexes were purified. The importance of the LIMP-2 *coiled-coil* domain for the mediation of β -GC interaction was confirmed by precipitation of recombinant β -GC by an isolated LIMP-2 coiled-coil peptide. Finally, the tertiary structure of the *coiled-coil* motif was elucidated.

The insights gained from this study represent the basis for future structural analyses, which could then lead to the complete protein structure determination of LIMP-2.

8 Literaturverzeichnis

- Abraham, D., Muir, H., Olsen, I. and Winchester, B. (1985). Direct enzyme transfer from lymphocytes corrects a lysosomal storage disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 129(2), 417-425.
- Aerts, J. M., Schram, A. W., Strijland, A., van Weely, S., Jonsson, L. M., Tager, J. M., Sorrell, S. H., Ginns, E. I., Barranger, J. A., and Murray, G. J. (1988). Glucocerebrosidase, a lysosomal enzyme that does not undergo oligosaccharide phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 964, 303–308.
- Akasaki, K., Michihara, A., Fukuzawa, M., Kinoshita, H. and Tsuji, H. (1994). Cycling of an 85-kDa lysosomal membrane glycoprotein between the cell surface and lysosomes in cultured rat hepatocytes. *J Biochem.* 116(3), 670-676.
- Allavena, P., Chieppa, M., Monti, P. and Piemonti, L. (2004). From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *CritRev Immunol.* 24(3), 179-192. Review.
- Atrian, S., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Chabás, A., Vilageliu, L. and Grinberg, D. (2008). An evolutionary and structure-based docking model for glucocerebrosidase-saposin C and glucocerebrosidase-substrate interactions-Relevance for Gaucher disease. *Proteins.* 70(3), 882-891.
- Aula, P. and Gahl, W. A. (2001). Sialic Acid Storage Diseases. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* McGraw-Hill Companies, Inc., Eighth Edition, pp. 5109–5120.
- Badhwar, A., Berkovic, S. F., Dowling, J. P., Gonzales, M., Narayanan, S., Brodtmann, A., Berzen, L., Caviness, J., Trenkwalder, C., Winkelmann, J., Rivest, J., Lambert, M., Hernandez-Cossio, O., Carpenter, S., Andermann, F. and Andermann, E. (2004). Action myoclonus-renal failure syndrome: characterization of a unique cerebro-renal disorder. *Brain.* 127(Pt 10), 2173-2182.
- Balreira, A., Gaspar, P., Caiola, D., Chaves, J., Beirão, I., Lima, J. L., Azevedo, J. E. and Miranda, M. C. (2008). A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet.* 17(14), 2238-2243.
- Bangert, I., Tumulka, F. and Abele, R. (2011). The lysosomal polypeptide transporter TAPL: more than a housekeeping factor? *Biol Chem.* 392(1-2), 61-66. Review
- Barriocanal, J. G., Bonifacino, J. S., Yuan, L., and Sandoval, I. V. (1986). Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 261 (35), 16755-16763.
- Bejarano, E. and Cuervo, A. M. (2010). Chaperone-mediated autophagy. *Proc Am Thorac Soc.* 7(1), 29-39. Review.
- Behnke, J., Eskelinen, E. L., Saftig, P. and Schröder, B. (2011). Two dileucine motifs mediate late endosomal/lysosomal targeting of transmembrane protein 192 (TMEM192) and a C-terminal cysteine residue is responsible for disulfide bond formation in TMEM192 homodimers. *Biochem J.* 434(2), 219-231.

- Berkovic, S. F., Dibbens, L. M., Oshlack, A., Silver, J. D., Katerelos, M., Vears, D. F., Lüllmann-Rauch, R., Blanz, J., Zhang, K. W., Stankovich, J., Kalnins, R. M., Dowling, J. P., Andermann, E., Andermann, F., Faldini, E., D'Hooge, R., Vadlamudi, L., Macdonell, R. A., Hodgson, B. L., Bayly, M. A., Savige, J., Mulley, J. C., Smyth, G. K., Power, D. A., Saftig, P. and Bahlo, M. (2008). Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/ LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet.* 82(3). 673-684.
- Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E. J., Anderson, R. G., Xu, S. and Krieger, M. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem.* 272(20), 13242-13249
- Beutler, E. (1991). Gaucher's disease. *N Engl J Med* 325, 1354-1360.
- Beutler, E. (2006). Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder. *Acta Paediatr Suppl* 95, 103-109.
- Beutler, E. and Grabowski, G. A. (2001). In Scriver, C. R., Sly, W. S., Childs, B., Beaudet, A. L., Valle, D., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2001). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, Inc., New York, USA, 3635–3668.
- Biegstraaten, M., van Schaik, I. N., Aerts, J. M. and Hollak, C. E. (2008). 'Non-neuronopathic' Gaucher disease reconsidered. Prevalence of neurological manifestations in a Dutch cohort of type I Gaucher disease patients and a systematic review of the literature. *J Inherit Metab Dis.* 31(3), 337-349.
- Blanz, J., Groth, J., Zachos, C., Wehling, C., Saftig, P. and Schwake, M. (2010). Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. *Hum Mol Genet.* 19(4), 563-572.
- Bleistein, J., Heidrich, H. G., and Debusch, H. (1980). The phospholipids of liver lysosomes from untreated rats. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 361, 595-597.
- Bond, J. S. and Butler, P. E. (1987). Intracellular proteases. *Annu Rev Biochem.* 56, 333-364. Review.
- Bonifacino, J. S., and Dell'Angelica, E. C. (1999). Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* 145, 923-926.
- Braakman, I., Helenius, J. and Helenius, A. (1992). Role of ATP and disulphide bonds during protein folding in the endoplasmic reticulum. *Nature.* 356(6366), 260-262.
- Braulke, T. and Bonifacino, J. S. (2008) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1793(4), 605-614. Review.
- Brown, W. J., Goodhouse, J. and Farquhar, M. G. (1986). Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *J Cell Biol.* 103(4), 1235-1247.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M. (1987). XL1-Blue - a high-efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques.* 5, 376-379.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell. Biol.* 11, 82–88.

- Butters, T. D., Sparks, L. M., Harlos, K., Ikemizu, S., Stuart, D. I., Jones, E. Y. and Davis, S. J. (1999). Effects of N-butyldeoxynojirimycin and the Lec3.2.8.1 mutant phenotype on N-glycan processing in Chinese hamster ovary cells: application to glycoprotein crystallization. *Protein Sci.* 8, 1696-1701.
- Cachianes, G., Ho, C., Weber, R. F., Williams, S. R., Goeddel, D. V. and Leung, D. W. (1993). Epstein-Barr virus-derived vectors for transient and stable expression of recombinant proteins. *Biotechniques* 15, 255-259.
- Calvo, D., Dopazo, J. and Vega, M. A. (1995). The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics*. 25(1), 100-106.
- Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K. and Morales, C. R. (2008). Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem Biophys Res Commun.* 373(2), 292-297.
- Canuel, M., Bhattacharyya, N., Balbis, A., Yuan, L. and Morales, C. R. (2009). Sortilin and prosaposin localize to detergent-resistant membrane microdomains. *Exp Cell Res.* 315(2), 240-247.
- Carson, M. (1991). Ribbons 2.0. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 946-950.
- Chang, V. T., Crispin, M., Aricescu, A. R., Harvey, D. J., Nettleship, J. E., Fennelly, J. A., Yu, C., Boles, K. S., Evans, E. J., Stuart, D. I., Dwek, R. A., Jones, E. Y., Owens, R. J. and Davis, S. J. (2007). Glycoprotein Structural Genomics: Solving the Glycosylation Problem. *Structure* 15, 267-273.
- Chen, G. C. and Yang, J. T. (1977). Two-Point Calibration of Circular Dichrometer with d-10-Camphorsulfonic Acid. *Analytical Letters*. 10(14), 1195-1207.
- Chen, R., Jiang, X., Sun, D., Han, G., Wang, F., Ye, M., Wang, L. and Zou, H. (2009). Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J Proteome Res.* 8(2), 651-661.
- Cohen, C. and Parry, D. A. (1994). Alpha-helical coiled coils: more facts and better predictions. *Science*. 263(5146), 488-489. Erratum in: *Science*. 264(5162), 1068.
- Connelly, M. A. and Williams, D. L. (2004). Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr Opin Lipidol.* 15(3), 287-295. Review.
- Crombie, R. and Silverstein, R. (1998). Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif. *J Biol Chem.* 273(9), 4855-4863.
- Cuervo, A. M. and Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*. 273(5274), 501-503.
- Daniels, R., Kurowski, B., Johnson, A. E. and Hebert, D. N. (2003). N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. *Mol Cell.* 11(1), 79-90.
- Danon, M. J., Oh, S. J., DiMauro, S., Manaligod, J. R., Eastwood, A., Naidu, S., and Schliselfeld, L. H. (1981). Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* 31, 51-57.
- Dardis, A., Filocamo, M., Grossi, S., Ciana, G., Franceschetti, S., Dominissini, S., Rubboli, G., Di Rocco, M. and Bembi, B. (2009). Biochemical and molecular findings in a patient

- with myoclonic epilepsy due to a mistarget of the beta-glucosidase enzyme. *Mol Genet Metab.* 97(4), 309-311.
- Daviet, L., Malvoisin, E., Wild, T. F. and McGregor, J. L. (1997). Thrombospondin induces dimerization of membrane-bound, but not soluble CD36. *Thromb Haemost.* 78(2), 897-901.
- Davis, S. J., Davies, E. A., Barclay, A. N., Daenke, S., Bodian, D. L., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Butters, T. D., Dwek, R. A. and van der Merwe, P. A. (1995). Ligand binding by the immunoglobulin superfamily recognition molecule CD2 is glycosylation-independent. *J Biol Chem* 270, 369-375.
- de Duve, C. (1983). Lysosomes revisited. *Eur J Biochem* 137(3):391-397.
- de Duve, C. (2005). The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol.* 7(9):847-849.
- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., Caplan, S. and Bonifacino, J. S. (2000). Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 14(10), 1265-1278. Review
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. and Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR*, 6(3), 277-293.
- Dell'Angelica, E. C., Shotelersuk, V., Aguilar, R. C., Gahl, W. A. and Bonifacino, J. S. (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell.* 3(1), 11-21.
- Dibbens, L. M., Karakis, I., Bayly, M. A., Costello, D. J., Cole, A. J. and Berkovic, S. F. (2011). Mutation of SCARB2 in a patient with progressive myoclonus epilepsy and demyelinating peripheral neuropathy. *Arch Neurol.* 68(6), 812-813.
- Dibbens, L. M., Michelucci, R., Gambardella, A., Andermann, F., Rubboli, G., Bayly, M. A., Joensuu, T., Vears, D. F., Franceschetti, S., Canafoglia, L., Wallace, R., Bassuk, A. G., Power, D. A., Tassinari, C. A., Andermann, E., Lehesjoki, A. E. and Berkovic, S. F. (2009). SCARB2 mutations in progressive myoclonus epilepsy (PME) without renal failure. *Ann Neurol.* 66(4), 532-536.
- Dittmer, F. D., Ulbrich, E. J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R., and von Figura, K. (1999). Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptordeficient mice are cell type-specific. *J. Cell Sci.* 112, 1591–1597.
- Dvir, H., Harel, M., McCarthy, A. A., Toker, L., Silman, I., Futerman, A. H. and Sussman, J. L. (2003). X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep.* 4(7), 704-709.
- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954.
- Elbein, A. D., Tropea, J. E., Mitchell, M. and Kaushal, G. P. (1990). Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I. *J Biol Chem.* 265(26), 15599-15605.
- Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., and Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13, 137-145.
- Esko, J. D. and Bertozzi, C. R. (2009). Chemical Tools for Inhibiting Glycosylation. In: Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press

- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(11), 917-929. Review
- Fujita, H., Ezaki, J., Noguchi, Y., Kono, A., Himeno, M., and Kato, K. (1991). Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 444-452.
- Fujita, H., Takata, Y., Kono, A., Tanaka, Y., Takahashi, T., Himeno, M. and Kato, K. (1992). Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85 kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 184(2), 604-611.
- Fujita, H., Saeki, M., Yasunaga, K., Ueda, T., Imoto, T. and Himeno, M. (1999). In vitro binding study of adaptor protein complex (AP-1) to lysosomal targeting motif (LI-motif). *Biochem Biophys Res Commun.* 255(1), 54-58.
- Futerman, A. H., and van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 554-565.
- Gaidukov, L., Nager, A. R., Xu, S., Penman, M. and Krieger, M. (2011). Glycine dimerization motif in the N-terminal transmembrane domain of the high density lipoprotein receptor SR-BI required for normal receptor oligomerization and lipid transport. *J Biol Chem.* 286(21), 18452-18464.
- Gamp, A. C., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Wittke, D., D'Hooge, R., De Deyn, P. P., Moser, T., Maier, H., Hartmann, D., Reiss, K., Illert, A. L., von Figura, K. and Saftig, P. (2003). LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Hum Mol Genet.* 12(6), 631-646.
- Gelfman, C. M., Vogel, P., Issa, T. M., Turner, C. A., Lee, W. S., Kornfeld, S. and Rice, D. S. (2007). Mice lacking alpha/beta subunits of GlcNAc-1-phosphotransferase exhibit growth retardation, retinal degeneration, and secretory cell lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48(11), 5221-5228.
- Ghosh, P., Dahms, N. M. and Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(3), 202-212. Review.
- Gilbert, H. F. (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 63, 69-172. Review.
- Goldin, E., Zheng, W., Motabar, O., Southall, N., Choi, J. H., Marugan, J., Austin, C. P. and Sidransky, E. (2012). High throughput screening for small molecule therapy for Gaucher disease using patient tissue as the source of mutant glucocerebrosidase. *PLoS One.* 7(1), e29861.
- Gould, G. W. and Lippincott-Schwartz, J. (2009). New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(4), 287-292.
- Griffiths, G. M. and Argon, Y. (1995). Structure and biogenesis of lytic granules. *Curr Top Microbiol Immunol.* 198: 39-58. Review
- Groth, J. (2008). Strukturelle und funktionelle Untersuchung des lysosomalen integralen Membranproteins LIMP-II
- Gruarin, P., Thorne, R. F., Dorahy, D. J., Burns, G. F., Sitia, R. and Alessio, M. (2000). CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 275(2), 446-454.

- Günther, W., Lüchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A. and Jentsch, T. J. (1998). ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(14), 8075-8080.
- Güntert, P. (2004). Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol Biol.* 278, 353-378.
- Gupta, N., Oppenheim, I. M., Kauvar, E. F., Tayebi, N. and Sidransky, E. (2011). Type 2 Gaucher disease: phenotypic variation and genotypic heterogeneity. *Blood Cells Mol Dis.* 46(1), 75-84. Review.
- Hasilik, A., Waheed, A. and von Figura, K. (1981). Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDP-N-acetylglucosamine. Absence of the activity in I-cell fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 98(3), 761-767.
- Hebert, D. N., Zhang, J. X., Chen, W., Foellmer, B. and Helenius, A. (1997). The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin. *J Cell Biol.* 139(3), 613-623.
- Helenius, A. (1994). How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 5(3), 253-265. Review.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* 291(5512), 2364-2369. Review.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* 73, 1019-1049. Review
- Höning, S., Sandoval, I. V. and von Figura, K. (1998). A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3 *The EMBO Journal* 17(5), 1304–1314
- Hoosdally, S. J., Andress, E. J., Wooding, C., Martin, C. A. and Linton, K. J. (2009). The Human Scavenger Receptor CD36: glycosylation status and its role in trafficking and function. *J Biol Chem.* 284(24), 16277-16288.
- Hopfner, F., Schormair, B., Knauf, F., Berthele, A., Tölle, T. R., Baron, R., Maier, C., Treede, R. D., Binder, A., Sommer, C., Maihöfner, C., Kunz, W., Zimprich, F., Heemann, U., Pfeufer, A., Näbauer, M., Kääh, S., Nowak, B., Gieger, C., Lichtner, P., Trenkwalder, C., Oexle, K. and Winkelmann, J. (2011). Novel SCARB2 mutation in action myoclonus-renal failure syndrome and evaluation of SCARB2 mutations in isolated AMRF features. *BMC Neurol.* 11, 134.
- Hruska, K. S., LaMarca, M. E., Scott, C. R. and Sidransky, E. (2008). Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat.* 29(5), 567-583. Review.
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., Nomoto, A. and Azhar, S. (2011). Differential roles of cysteine residues in the cellular trafficking, dimerization, and function of the high-density lipoprotein receptor, SR-BI. *Biochemistry.* 50(50), 10860-10875.
- Hurtley, S. M. and Helenius, A. (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol.* 5, 277-307. Review.
- Huynh, K. K., Eskelinen, E. L., Scott, C. C., Malevanets, A., Saftig, P. and Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J.* 26(2), 313-324.

- Jäättelä, M. (2004). Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene*. 23(16), 2746-2756. Review.
- Jarvis, D. L. (2003). Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology*. 310(1), 1-7. Review.
- Jimenez-Dalmaroni, M. J., Xiao, N., Corper, A. L., Verdino, P., Ainge, G. D., Larsen, D. S., Painter, G. F., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Hoebe, K., Beutler, B. and Wilson, I. A. (2009). Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2. *PLoS One*. 4(10), e7411.
- Johnson, B. A. (2004). Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol Biol*, 278, 313-352.
- Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Roux, F. and Garin, J. (2002). Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics*. 2(8), 1026-1040.
- Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C. and Gasnier, B. (2001). Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *EMBO J*. 20(21), 5940-5949.
- Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Honda, S., Kosugi, S., Shiraga, M., Nagao, N., Sekiguchi, S., Kanayama, Y., Kurata, Y. and Matsuzawa, Y. (1995). Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C-->T substitution (proline90-->serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. *J Clin Invest*. 95(3), 1040-1046.
- Knipper, M., Claussen, C., Rüttiger, L., Zimmermann, U., Lüllmann-Rauch, R., Eskelinen, E. L., Schröder, J., Schwake, M. and Saftig, P. (2006). Deafness in LIMP2-deficient mice due to early loss of the potassium channel KCNQ1/KCNE1 in marginal cells of the stria vascularis. *J Physiol*. 576(Pt 1), 73-86.
- Koradi, R., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph*. 14(1), 51-55, 29-32.
- Kornfeld, S., and Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5, 483-525.
- Kornfeld, S. and Sly, W. S. (1995). I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: Disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D. (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (7th ed), 2495-2508. New York: McGraw Hill
- Krieger, M. and Herz, J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem*. 63, 601-637. Review
- Kundra, R., and Kornfeld, S. (1999). Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J. Biol. Chem*. 274 (43), 31039-31046.
- Kuronita, T., Eskelinen, E. L., Fujita, H., Saftig, P., Himeno, M. and Tanaka, Y. (2002). A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci*. 115(Pt 21), 4117-4131.
- Kuronita, T., Hatano, T., Furuyama, A., Hirota, Y., Masuyama, N., Saftig, P., Himeno, M., Fujita, H. and Tanaka, Y. (2005). The NH(2)-terminal transmembrane and luminal domains of LGP85 are needed for the formation of enlarged endosomes/lysosomes. *Traffic* 6(10), 895-906.

- Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U. and Hoflack, B. (1998). The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* 273(45), 29451-29461.
- Lee, J. E., Fusco, M. L. and Saphire, E. O. (2009). An efficient platform for screening expression and crystallization of glycoproteins produced in human cells. *Nat Protoc.* 4(4), 592-604.
- Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A. J., Canuel, M. and Morales, C. R. (2003). The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J.* 22(24), 6430-6437. Erratum in: *EMBO J.* 23(7), 1680.
- Lenertz, L. Y., Wang, Z., Guadarrama, A., Hill, L. M., Gavala, M. L. and Bertics, P. J. (2010). Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X7 reveals a key residue important for receptor function. *Biochemistry.* 49(22), 4611-4619.
- Leroy, J. G. and Demars R. I. (1967). Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts. *Science.* 157(3790), 804-806.
- Lewis, V., Green, S. A., Marsh, M., Vihko, P., Helenius, A. and Mellman, I. (1985). Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J Cell Biol.* 100(6), 1839-1847.
- Lieberman, R. L. (2011). A Guided Tour of the Structural Biology of Gaucher Disease: Acid- β -Glucosidase and Saposin C. *Enzyme Res.* 2011, 973231.
- Lloyd, J. B., and Forster, S. (1986). The lysosomal membrane. *TRENDS Biochem. Science.* 11, 365-368.
- Lottspeich & Engels Hrsg., Bioanalytik 2.Auflage 2006.
- Lübke, T., Lobel, P. and Sleat, D. E. (2009). Proteomics of the lysosome. *Biochim Biophys Acta.* 1793(4), 625-635. Review
- Lüllmann-Rauch, R. (2005). In: Saftig, P. (2005). Lysosomes. Medical Intelligence unit, Lands Bioscience / Eurekah, Springer Science+Business Media, 2.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.*, 21, 375-382.
- Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science.* 252(5010), 1162-1164.
- Luzio, J. P., Poupon, V., Lindsay, M. R., Mullock, B. M., Piper, R. C., and Pryor, P. R. (2003). Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol Membr Biol* 20, 141-154.
- Luzio, J. P., Rous, B. A., Bright, N. A., Pryor, P. R., Mullock, B. M., and Piper, R. C. (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 113 (Pt 9), 1515-1524.
- Malicdan, M. C., Noguchi, S., Nonaka, I., Saftig, P. and Nishino, I. (2008). Lysosomal myopathies: an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle. *Neuromuscul Disord.* 18(7), 521-529. Review
- Mamathambika, B. S. and Bardwell, J. C. (2008). Disulfide-linked protein folding pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24, 211-235. Review.
- Manning, M. and Colón, W. (2004). Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. *Biochemistry.* 43(35), 11248-11254.

- Martin, C. A., Longman, E., Wooding, C., Hoosdally, S. J., Ali, S., Aitman, T. J., Gutmann, D. A., Freemont, P. S., Byrne, B. and Linton, K. J. (2007). Cd36, a class B scavenger receptor, functions as a monomer to bind acetylated and oxidized low-density lipoproteins. *Protein Sci.* 16(11), 2531-2541.
- Martin, J. J., Leroy, J. G., van Eygen, M. and Ceuterick, C. (1984). I-cell disease. A further report on its pathology. *Acta Neuropathol.* 64(3), 234-242.
- Meissner, P., Pick, H., Kulangara, A., Chatellard, P., Friedrich, K. and Wurm, F. M. (2001). Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells. *Biotechnol Bioeng* 75, 197-203.
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N. and Surolia, A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci.* 31(3), 156-163. Review. Erratum in: *Trends Biochem Sci.* 31(5), 251.
- Nettleship, J. E., Assenberg, R., Diprose, J. M., Rahman-Huq, N. and Owens, R. J. (2010). Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. *J Struct Biol* 172, 55-65.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9(6), 255-262.
- Ni, X. and Morales, C. R. (2006). The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic.* 7(7), 889-902.
- Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J. E., Oh, S. J., Koga, Y., Sue, C. M., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., DiMauro, S., Hirano, M. (2000). Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature.* 406(6798), 906-910.
- Niwa, K., Tanaka, R., Murase, H., Ishikawa, T., Fujita, H., Himeno, M. and Tanaka, Y. (2003). Two lysosomal membrane proteins, LGP85 and LGP107, are delivered to late endosomes/lysosomes through different intracellular routes after exiting from the trans-Golgi network. *Biochem Biophys Res Commun.* 301(4), 833-840.
- O'Brien, J. S. and Kishimoto, Y. (1991). Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J.* 5(3), 301-308.
- Odani, S., Namba, Y., Ishii, A., Ono, T. and Fujii, H. (2000). Disulfide bonds in rat cutaneous fatty acid-binding protein. *J. Biochem.* 128, 355-361.
- Ogata, S., and Fukuda, M. (1994). Lysosomal targeting of Limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 269, 5210-5217.
- Okazaki, I., Himeno, M., Ezaki, J., Ishikawa, T. and Kato, K. (1992). Purification and characterization of an 85 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *J Biochem.* 111(6), 763-769.
- Olsen, I., Dean, M. F., Harris, G. and Muir, H. (1981). Direct transfer of a lysosomal enzyme from lymphoid cells to deficient fibroblasts. *Nature.* 291(5812), 244-247.
- Olsen, I., Muir, H., Smith, R., Fensom, A. and Watt, D. J. (1983). Direct enzyme transfer from lymphocytes is specific. *Nature.* 306(5938), 75-77.

- Papale, G. A., Hanson, P. J. and Sahoo, D. (2011). Extracellular disulfide bonds support scavenger receptor class B type I-mediated cholesterol transport. *Biochemistry*. 50(28), 6245-6254.
- Parkinson-Lawrence, E. J., Shandala, T., Prodoehl, M., Plew, R., Borlace, G. N. and Brooks, D. A. (2010). Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiology (Bethesda)*. 25(2), 102-115. Review
- Parodi, A. J. (2000). Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem*. 69, 69-93. Review.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*. 11, 2411-2423.
- Peden, A. A., Oorschot, V., Hesser, B. A., Austin, C. D., Scheller, R. H. and Klumperman, J. (2004). Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *J Cell Biol*. 164(7), 1065-1076.
- Petrescu, A. J., Milac, A. L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A. and Wormald, M. R. (2004). Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology* 14, 103-114.
- Ra , M. E., Safranow, K. and Poncyljusz, W. (2007). Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med*. 13(5-6), 288-296.
- Raposo, G and Marks, M. S. (2007). Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(10):786-797. Review
- Rasmussen, J. T., Berglund, L., Rasmussen, M. S. and Petersen, T. E. (1998). Assignment of disulfide bridges in bovine CD36. *Eur J Biochem*. 257(2), 488-494.
- Reaven, E., Cortez, Y., Leers-Sucheta, S., Nomoto, A. and Azhar, S. (2004). Dimerization of the scavenger receptor class B type I: formation, function, and localization in diverse cells and tissues. *J Lipid Res*. 45(3), 513-528.
- Reaven, E., Nomoto, A., Cortez, Y. and Azhar, S. (2006). Consequences of over-expression of rat Scavenger Receptor, SR-BI, in an adrenal cell model. *Nutr Metab (Lond)*. 3, 43.
- Reczek, D., Schwake, M., Schroder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T., and Saftig, P. (2007). LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of beta-Glucocerebrosidase. *Cell* 131, 770-783.
- Reddy, A., Caler, E. V. and Andrews, N. W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*. 106(2), 157-169.
- Reitman, M. L., Varki, A. and Kornfeld, S. (1981). Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity. *J Clin Invest*. 67(5), 1574-1579.
- Renlund, M., Tietze, F., and Gahl, W. A. (1986). Defective sialic acid egress from isolated fibroblast lysosomes of patients with Salla disease. *Science* 232, 759-762.
- Robinson, M. S., and Bonifacino, J. S. (2001). Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13, 444-453.
- Rodionov, D. G., Höning, S., Silye, A., Kongsvik, T. L., von Figura, K. and Bakke, O. (2002). Structural requirements for interactions between leucine-sorting signals and clathrin-associated adaptor protein complex AP3. *J Biol Chem*. 277(49), 47436-47443.

- Rose, J. K. and Doms, R. W. (1988). Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol.* 4, 257-288. Review.
- Rubboli, G., Franceschetti, S., Berkovic, S. F., Canafoglia, L., Gambardella, A., Dibbens, L. M., Riguzzi, P., Campieri, C., Magaudo, A., Tassinari, C. A. and Michelucci, R. (2011). Clinical and neurophysiologic features of progressive myoclonus epilepsy without renal failure caused by SCARB2 mutations. *Epilepsia.* 52(12), 2356-2363.
- Ruivo, R., Anne, C., Sagné, C. and Gasnier, B. (2008). Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochim Biophys Acta.* 1793(4), 636-649. Review.
- Saftig, P. and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(9), 623-635. Review
- Sahoo, D., Darlington, Y. F., Pop, D., Williams, D. L. and Connelly, M. A. (2007). Scavenger receptor class B Type I (SR-BI) assembles into detergent-sensitive dimers and tetramers. *Biochim Biophys Acta.* 1771(7), 807-817. (A)
- Sahoo, D., Peng, Y., Smith, J. R., Darlington, Y. F. and Connelly, M.A. (2007). Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) homo-dimerizes via its C-terminal region: fluorescence resonance energy transfer analysis. *Biochim Biophys Acta.* 1771(7), 818-829. (B)
- Sandoval, I. V., Arredondo, J. J., Alcalde, J., Gonzalez Noriega, A., Vandekerckhove, J., Jimenez, M. A., and Rico, M. (1994). The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. *J Biol Chem* 269, 6622-6631.
- Sawkar, A. R., D'Haese, W. and Kelly, J. W. (2006). Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders--a focus on Gaucher disease. *Cell Mol Life Sci.* 63(10), 1179-1192.
- Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 66, 511-548.
- Schmitz, M., Alfalah, M., Aerts, J. M., Naim, H. Y., and Zimmer, K. P. (2005). Impaired trafficking of mutants of lysosomal glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2310-2320.
- Schröder, B., Wrocklage, C., Pan, C., Jäger, R., Kösters, B., Schäfer, H., Elsässer, H. P., Mann, M. and Hasilik, A. (2007). Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic.* 8(12), 1676-1686.
- Schroen, B., Leenders, J. J., van Erk, A., Bertrand, A. T., van Loon, M., van Leeuwen, R. E., Kubben, N., Duisters, R. F., Schellings, M. W., Janssen, B. J., Debets, J. J., Schwake, M., Høydal, M. A., Heymans, S., Saftig, P. and Pinto, Y. M. (2007). Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy. *J Exp Med.* 204(5), 1227-1235.
- Schuette, C. G., Pierstorff, B., Huettler, S. and Sandhoff, K. (2001). Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis. *Glycobiology.* 11(6), 81R-90R. Review.
- Serghides, L., Crandall, I., Hull, E. and Kain, K. C. (1998). The Plasmodium falciparum-CD36 interaction is modified by a single amino acid substitution in CD36. *Blood.* 92(5), 1814-1819.

- Shental-Bechor, D. and Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(24), 8256-8261. PMID: PMC2448824.
- Silverstein, R. L. and Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*. 2(72), re3. Review.
- Skinner, M. P., Lucas, C. M., Burns, G. F., Chesterman, C. N. and Berndt, M. C. (1991). GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. *J Biol Chem*. 266(9), 5371-5374.
- Smith, M. H., Ploegh, H. L. and Weissman, J. S. (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*. 334(6059), 1086-1090. Review.
- Stanley, P. (1989). Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. *Mol Cell Biol*. 9(2), 377-383.
- Suchanek, M., Radzikowska, A. and Thiele, C. (2005). Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat Methods*. 2(4), 261-267.
- Tabuchi, N., Akasaki, K., and Tsuji, H. (2002). Ile (476), a constituent of di-leucine-based motif of a major lysosomal membrane protein, LAMP2/LIMP II, is important for its proper distribution in late endosomes and lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 149-156.
- Tabuchi, N., Akasaki, K. and Tsuji, H. (2000). Two acidic amino acid residues, Asp(470) and Glu(471), contained in the carboxyl cytoplasmic tail of a major lysosomal membrane protein, LAMP2/LIMP II, are important for its accumulation in secondary lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 270(2), 557-563.
- Tabuchi, N., Akasaki, K., Sasaki, T., Kanda, N. and Tsuji, H. (1997). Identification and characterization of a major lysosomal membrane glycoprotein, LAMP2/LIMP II in mouse liver. *J Biochem*. 122(4), 756-763.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von Figura, K. and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*. 406(6798), 902-906.
- Taylor, M. E. and Drickamer, K. (2003). Structure-function analysis of C-type animal lectins. *Methods Enzymol*. 363, 3-16.
- Theophilus, B., Latham, T., Grabowski, G. A. and Smith, F.I. (1989). Gaucher disease: molecular heterogeneity and phenotype-genotype correlations. *Am J Hum Genet*. 45(2), 212-225.
- Thorne, R. F., Meldrum, C. J., Harris, S. J., Dorahy, D. J., Shafren, D. R., Berndt, M. C., Burns, G. F. and Gibson, P. G. (1997). CD36 forms covalently associated dimers and multimers in platelets and transfected COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 240(3), 812-818.
- Thornton, J. M. (1981). Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol*. 151(2), 261-287.
- Tom, R., Bisson, L. and Durocher, Y. (2008). Transfection of HEK293-EBNA1 Cells in Suspension with Linear PEI for Production of Recombinant Proteins. *CSH Protoc*. 1 2008 pdb.prot4977. doi: 10.1101/pdb.prot4977.

- Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S. A., Callen, D. F., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G. P., van't Hoff, W. and Antignac, C. (1998). A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet.* 18(4), 319-324.
- Trombetta, E. S. and Helenius, A. (1998). Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol.* 8(5), 587-592. Review.
- Valenzano, K. J., Khanna, R., Powe, A. C., Boyd, R., Lee, G., Flanagan, J. J. and Benjamin, E. R. (2011). Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. *Assay Drug Dev Technol.* 9(3), 213-235. Review.
- van Dongen, J. M., Willemsen, R., Ginns, E. I., Sips, H. J., Tager, J. M., Barranger, J. A., and Reuser, A. J. (1985). The subcellular localization of soluble and membrane-bound lysosomal enzymes in I-cell fibroblasts: a comparative immunocytochemical study. *Eur. J. Cell Biol.* 39, 179–189.
- van Gunsteren, W. F., Billeter, S. R., Eising, A. A. et al. (1996). *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide.* vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich, 1-1042.
- Vanier, M. T. and Millat, G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet.* 64(4), 269-281.
- van Meel, E. and Klumperman, J. (2008). Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol.* 129(3), 253-266. Review.
- Vega, M. A., Rodriguez, F., Segui, B., Cales, C., Alcalde, J., and Sandoval, I. V. (1991a). Targeting of lysosomal integral membrane protein LIMP II. The tyrosine-lacking carboxyl cytoplasmic tail of LIMP II is sufficient for direct targeting to lysosomes. *J Biol Chem* 266, 16269-16272.
- Vega, M. A., Segui-Real, B., Garcia, J. A., Cales, C., Rodriguez, F., Vanderkerckhove, J., and Sandoval, I. V. (1991b). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J Biol Chem* 266, 16818-16824.
- Velayati, A., DePaolo, J., Gupta, N., Choi, J. H., Moaven, N., Westbroek, W., Goker-Alpan, O., Goldin, E., Stubblefield, B. K., Kolodny, E., Tayebi, N. and Sidransky, E. (2011). A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease. *Hum Mutat.* 32(11), 1232-1238.
- Vellodi, A. (2005). Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol.* 128(4), 413-431. Review.
- Viñals, M., Xu, S., Vasile, E. and Krieger, M. (2003). Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem.* 278(7), 5325-5332.
- von Figura, K., and Hasilik, A. (1986). Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* 55, 167-193.
- von Figura, K., Hasilik, A., Pohlmann, R., Bräulke, T., Lemansky, P., and Stein, M. (1987). Mutations affecting transport and stability of lysosomal enzymes. *Enzyme* 38(1-4), 144-153.
- Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph.* 8(1), 52-56

- Waetzig, G. H., Chalaris, A., Rosenstiel, P., Suthaus, J., Holland, C., Karl, N., Vallés Uriarte, L., Till, A., Scheller, J., Grötzinger, J., Schreiber, S., Rose-John, S. and Seegert, D. (2010). N-linked glycosylation is essential for the stability but not the signaling function of the interleukin-6 signal transducer glycoprotein 130. *J Biol Chem.* 285(3), 1781-1789.
- Weiner, M. P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B., and Vaillancourt, P. (1994). Studier pET system vectors and hosts. *Strategies Mo. Bio.* 7(2), 41–43.
- Weis, W. I. and Drickamer, K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem.* 65, 441-473. Review.
- Wilke, S., Krausze, J., Gossen, M., Groebe, L., Jäger, V., Gherardi, E., van den Heuvel, J. and Büssow, K. (2010). Glycoprotein production for structure analysis with stable, glycosylation mutant CHO cell lines established by fluorescence-activated cell sorting. *Protein Sci* 19, 1264-1271.
- Yamayoshi, S. and Koike, S. (2011). Identification of a human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection. *J Virol.* 85(10), 4937-4946.
- Yamayoshi, S., Yamashita, Y., Li, J., Hanagata, N., Minowa, T., Takemura, T. and Koike, S. (2009). Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med.* 15(7), 798-801.
- Yap, T. L., Gruschus, J. M., Velayati, A., Westbroek, W., Goldin, E., Moaven, N., Sidransky, E. and Lee, J. C. (2011). Alpha-synuclein interacts with Glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. *J Biol Chem.* 286(32), 28080-28088.
- Yu, M., Romer, K. A., Nieland, T. J., Xu, S., Saenz-Vash, V., Penman, M., Yesilaltay, A., Carr, S. A. and Krieger, M. (2011). Exoplasmic cysteine Cys384 of the HDL receptor SR-BI is critical for its sensitivity to a small-molecule inhibitor and normal lipid transport activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(30), 12243-12248.
- Zhang, H., Li, X. J., Martin, D. B. and Aebersold, R. (2003). Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 21(6), 660-666.
- Ziegler, D. M. (1985). Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 305–329.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1-1: Schematische Darstellung der mit dem lysosomalen Kompartiment verknüpften Funktionen und Prozesse.	9
Abbildung 1.2-1: Ausgewählte Funktionen lysosomaler Membranproteine.	11
Abbildung 1.4-1: Transportwege lysosomaler Hydrolasen.	16
Abbildung 1.5-1: Schematische Darstellung der LIMP-2 Struktur.	18
Abbildung 1.5-2: Multiples Aminosäuren-Alignment der humanen CD36 Familie.	19
Abbildung 1.6-1: Sequenz Alignment verschiedener LIMP-2 Spezies.	22
Abbildung 1.7-1: Spektrum der homozygoten LIMP-2 AMRF Mutationen.	23
Abbildung 3.1-1: Struktur des Biotin-Tags mit Ttds-Linker.	39
Abbildung 3.2-1: CD-Spektren von Peptiden mit verschiedenen Konformationen.	65
Abbildung 3.2-2: Fließschema der wesentlichen Schritte bei der Analytik der in den HEK-Zellen hergestellten Proteine.	69
Abbildung 3.2-3: Schematische Darstellung der drei verschiedenen Glykosylierungstypen sowie der Schnittstellen und Spezifität von PNGaseF bzw. EndoH.	73
Abbildung 3.2-4: Struktur der chemischen Crosslinker DSS (links) und BS ³ (rechts).	77
Abbildung 3.2-5: Crosslink-Reaktions Schema der NHS-Ester.	77
Abbildung 3.2-6: Struktur der Aminosäuren-Derivate Photo-Leucin und Photo-Methionin (oben) sowie Reaktionsmechanismus zur Darstellung der reaktiven Carben-Zwischenstufe (unten).	78
Abbildung 3.2-7: Schematischer Ablauf des Crosslinks mit Photo-Aminosäuren.	80
Abbildung 3.2-8: Schematischer Aufbau <i>Semi-Dry-Blot</i> .	83
Abbildung 3.2-9: Schematischer Aufbau <i>Tank-Blot</i> .	84
Abbildung 3.2-10: (A) Durch β -GC katalysierte Reaktion. (B) Struktur des Substratanalogons 4-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid.	85
Abbildung 4.1-1: Bändermodell der luminalen Domäne von LIMP-2.	87
Abbildung 4.1-2: Schematische Darstellung der verschiedenen murinen LIMP-2 Glykosylierungsvarianten.	88
Abbildung 4.1-3: <i>Western-Blot</i> Ergebnisse: PNGaseF-Experimente der LIMP-2 Mutanten mit jeweils einer re-inserierten Glykosylierungsstelle.	90
Abbildung 4.1-4: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der LIMP-2 Varianten mit nur einer N-Glykosylierungsstelle in COS-7 Zellen.	91
Abbildung 4.1-5: Struktur der beiden L-Aminosäuren Asparagin und Glutamin.	92
Abbildung 4.1-6: Vergleich der Laufeigenschaften von in Hela Zellen exprimierten LIMP-2 Varianten mit jeweils einer entnommenen potentiellen N-Glykosylierungsstelle gegenüber LIMP-2 Wildtyp - <i>Western-Blot</i> Ergebnisse.	93
Abbildung 4.1-7: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der LIMP-2 Varianten mit je einer ausgetauschten N-Glykosylierungsstelle in Hela und COS-7 Zellen sowie in LIMP-2 Δ - MEFs.	96
Abbildung 4.1-8: <i>Western-Blot</i> : PNGaseF und EndoH Deglykosylierung von endogenem LIMP-2 aus COS-7 Zellen.	96
Abbildung 4.1-9: Schematische Darstellung der Auswertung der Deglykosylierung mittels EndoH zur Identifizierung EndoH resistenter bzw. sensibler N-Glykosylierungsstellen von LIMP-2.	97
Abbildung 4.1-10: <i>Western-Blots</i> : EndoH Behandlung der in COS-7 Zellen exprimierten Einzelaustausch-Varianten von LIMP-2.	98
Abbildung 4.1-11: <i>Western-Blot</i> : EndoH Behandlung ausgewählter Einzelaustausch-Varianten von LIMP-2 in LIMP-2 defizienten MEF und endogen in Wildtyp MEF.	100
Abbildung 4.1-12: Lokalisation der humanen LIMP-2-D122N Variante in COS-7 Zellen.	101
Abbildung 4.1-13: <i>Western-Blot</i> : PNGaseF und EndoH Behandlung der humanen LIMP-2-D122N Variante im Vergleich zum WT Protein in COS-7 Zellen.	101
Abbildung 4.1-14: Lokalisation der humanen LIMP-2-H363N Variante in COS-7 Zellen.	102
Abbildung 4.1-15: <i>Western-Blots</i> : Analyse der LIMP-2-H363N Punktmutation mittels PNGaseF und EndoH Behandlung.	103
Abbildung 4.1-16: Schematische Darstellung der Maskierung von N-Glykosylierungsstellen durch die Interaktion von LIMP-2 mit β -GC.	104
Abbildung 4.1-17: <i>Western-Blots</i> : Deglykosylierung von endogenem LIMP-2 durch PNGaseF und EndoH in Wildtyp und β -GC defizienten murinen embryonalen Fibroblasten.	104
Abbildung 4.2-1: Verschiedene Signale im <i>Western-Blot</i> nach Überexpression von LIMP-2 Wildtyp in COS-7 Zellen.	106
Abbildung 4.2-2: <i>Western-Blot</i> : LIMP-2 im Photo-Aminosäuren Assay endogen und nach Überexpression in COS-7 Zellen.	107
Abbildung 4.2-3: <i>Western-Blots</i> : Endogene Dimerisierung von LIMP-2 und β -GC mittels Photo-Aminosäuren in verschiedenen Zelllinien.	108
Abbildung 4.2-4: <i>Western-Blot</i> : Dimerisierung/Oligomerisierung mittels Photo-Aminosäuren von überexprimiertem LIMP-2 und β -GC in COS-7 Zellen.	109
Abbildung 4.2-5: <i>Western-Blots</i> : Dimerisierung verschiedener LIMP-2 Varianten nach Photo-Aminosäuren Behandlung in COS-7 Zellen.	110
Abbildung 4.2-6: Vergleich der auftretenden Bandenmuster im <i>Western-Blot</i> nach der Vernetzung über Photo-Aminosäuren und Probenlauf unter nicht reduzierenden Bedingungen.	112
Abbildung 4.2-7: Lokalisation ausgewählter LIMP-2 Cystein Varianten in COS-7 Zellen.	113
Abbildung 4.2-8: Vergleich der im <i>Western-Blot</i> auftretenden Banden unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen repräsentativer LIMP-2 Cystein Varianten.	114
Abbildung 4.2-9: Vergleich der im <i>Western-Blot</i> auftretenden Banden unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen einer LIMP-2 Variante ohne luminal Cysteine nach Überexpression in COS-7 Zellen, sowie des endogenen LIMP-2 Proteins.	114

Anhang

Abbildung 4.2-10: <i>Western-Blots</i> : Endogener intrazellulärer <i>Crosslink</i> mit DSS in LIMP-2 und β -GC defizienten murinen embryonalen Fibroblasten sowie Wildtyp Fibroblasten.	116
Abbildung 4.3-1: Coomassie-Färbung: Rekombinante Expression der luminalen LIMP-2 Domäne (hLIMP-2_R77-Y440) im <i>E.coli</i> Stamm BL21 und die Isolierung als <i>Inclusion bodies</i> .	117
Abbildung 4.3-2: Schematische Darstellung des Expressionskonstruktes zur Produktion der luminalen LIMP-2 Domäne (hLIMP-2-A32-E420) als Sekretionsprotein mit C-terminalen HIS-Tag.	118
Abbildung 4.3-3: Affinitätschromatographie zur Reinigung von LIMP-2-A32-E420-HIS-Tag.	119
Abbildung 4.3-4: SDS-PAGE Analyse des Affinitätschromatographie-Eluats nach PNGaseF und EndoH _f Behandlung mittels Coomassie-Färbung und <i>Western-Blot</i> .	120
Abbildung 4.3-5: Repräsentativer UV ₂₈₀ Kurvenverlauf der SEC des NiNTA Pools.	120
Abbildung 4.3-6: <i>Overlay</i> der UV ₂₈₀ Kurvenverläufe der SEC der Subpopulationen 1 und 2.	121
Abbildung 4.3-7: Analyse der SEC Subpopulationsfraktionen mittels Coomassie-Gelanalyse und <i>Western-Blot</i> nach TCA-Fällung.	121
Abbildung 4.3-8: <i>Western-Blot</i> : Vergleich zwischen reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zum Nachweis von Disulfid verbrückten Proteinkomplexen in der SEC Subpopulationsfraktion 1.	122
Abbildung 4.3-9: <i>Western-Blot</i> : BS ³ <i>Crosslink</i> der SEC Subpopulationsfraktion 1.	123
Abbildung 4.3-10: <i>Western-Blot</i> : BS ³ <i>Crosslink</i> rekombinant hergestellter β -GC (Cerezyme®).	123
Abbildung 4.3-11: IMAC zur Reinigung von LIMP-2_A32-E420-HIS-Tag und ko-exprimierter β -GC.	124
Abbildung 4.3-12: Repräsentativer UV ₂₈₀ Kurvenverlauf der SEC des NiNTA Pools.	125
Abbildung 4.3-13: Analyse der SEC Subpopulationsfraktionen mittels denaturierender SDS-Page unter reduzierenden (+ DTT) und nicht reduzierenden (- DTT) Bedingungen und anschließender Coomassie-Färbung.	125
Abbildung 4.3-14: <i>Western-Blots</i> : Vergleich zwischen reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zum Nachweis von Disulfid verbrückten Proteinkomplexen in den SEC Subpopulationsfraktionen.	126
Abbildung 4.4-1: Normiertes CD-Spektrum des LIMP-2_L152-V173 Peptides.	127
Abbildung 4.4-2: Tertiärstruktur des LIMP-2_L152-V173 Peptides.	128
Abbildung 4.4-3: Größenausschlusschromatographie des LIMP-2 <i>coiled-coil</i> Peptides LIMP-2_L152-V173.	129
Abbildung 4.4-4: Normiertes CD-Spektrum des Biotin-Ttds-LIMP-2_L152-E175 Peptides.	130
Abbildung 4.4-5: Größenausschlusschromatographie des biotinylierten LIMP-2 <i>coiled-coil</i> Peptides Biotin-Ttds-LIMP-2_L152-E175.	131
Abbildung 4.4-6: Schematische Darstellung der Ko-Präzipitation von β -GC durch das biotinylierte LIMP-2 <i>coiled-coil</i> Peptid Biotin-Ttds-LIMP-2_L152-E175 über Streptavidin-Agarose <i>beads</i> .	131
Abbildung 4.4-7: Konzentrationsabhängige Ko-Präzipitation von rekombinanter β -GC durch ein biotinyliertes LIMP-2 <i>coiled-coil</i> Peptid.	132
Abbildung 4.4-8: Überprüfung der Spezifität der Ko-Präzipitation von rekombinanter β -GC durch ein biotinyliertes LIMP-2 <i>coiled-coil</i> Peptid.	133
Abbildung 4.4-9: Quantifizierung des β -GC Aktivitätsassays.	134
Abbildung 4.4-10: Quantifizierung des β -GC Aktivitätsassays.	135
Abbildung 5.1-1: Schematische Darstellung der N-Glykosylierungsstellen innerhalb der CD-36 Protein-Superfamilie.	139
Abbildung 5.2-1: Schematische Darstellung des LIMP-2 / β -GC Komplex.	147

9.2 Abkürzungen

Å	Angström ($10\text{Å} = 1\text{nm}$)
A	Absorption
A	Ampere
AF	Alexa Fluor
AP	Adaptorprotein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure/n
ATP	Adenosintriphosphat
AU	willkürliche Einheiten (<i>arbitrary unit</i>)
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BS ³	<i>Bissulfosuccinimidyl suberate</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD	Zirkulardichroismus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)
CMA	Chaperon-vermittelten Autophagie (<i>chaperone mediated autophagy</i>)
CoIP	Ko-Immunpräzipitation
Cos	Nieren-Fibroblasten aus der afrikanischen Grünen Meerkatze
C-Terminus	Carboxyterminus
d	Durchmesser
Da	Dalton
DABCO	Diazobicyclooctan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSS	<i>Disuccinimidyl suberate</i>
E. coli	Escherichia coli
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (Western-Blot Detektionssystem)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FastAP	alkalische Phosphatase
FCS	Fötale Kälberserum
FE	frühes Endosom
g	Gramm
β-GC	beta-Glucocerebrosidase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	<i>human</i>
h	Stunde (<i>hours</i>)
HA	Influenza Hämagglutinin-Epitop
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i> (menschliche embryonale Nierenzellen)
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horse Radish Peroxidase</i>)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobin
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

Anhang

ko	<i>knock-out</i>
L	Liter
LAMP	lysosomal assoziiertes Membranprotein
LB	Bakterienanzuchtmedium (<i>lysogeny broth</i>)
Leu	Leucin
LGP	lysosomales Glykoprotein
li.	links
LIMP	lysosomales integrales Membranprotein
LRO	Lysosom-ähnliche Organellen
m	murin
M	molar; Mol/Liter
M6P	Mannose-6-Phosphat
MPR	Mannose-6-Phosphat Rezeptor
mA	Milliampere
MEF	<i>murine</i> embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mi.	mitte
min	Minuten
ml	Milliliter
MPR	Mannose-6-Phosphat-rezeptor
MPS	Mukopolysaccharidose
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
N-Terminus	Aminoterminus
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
o.	oben
OD _{xyz}	optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = XYZ$ nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P/S	Pen-Strep Lösung (Benzylpenicillin-Procaïn & Dihydrostreptomycin)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
re.	rechts
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	spätes Endosom
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> (= Größenausschlusschromatographie)
sek	Sekunde
Std	Stunde
SV	<i>Simian</i> Virus
t	Zeit
T	Temperatur
TAE	Tris/EDTA/Essigsäure-Puffer
TAPL	<i>transporter associated with antigen processing-like</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung
TBST	trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
Temed	Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Trp	Tryptophan

Anhang

u.	unten
UBP	Ubiquitin-spezifische Proteasen
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
V	Volt
V	Volumen
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche
WB	<i>Western-Blot</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren:

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Desoxyribonukleinsäuren

Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T

9.3 Lebenslauf

Name	Johann Groth
Geburtsdatum	03.03.1983
Geburtsort	Rendsburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
seit 04 / 2012	Wissenschaftlicher Angestellter im Bereich Qualitätskontrolle bei der Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG
10/2011 – 03/2012	Studentisches Aushilfe im Bereich Qualitätskontrolle bei der Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG
06/2008 – 11/2011	Wissenschaftlicher Angestellter mit der Zielsetzung Promotion in der AG Prof. Dr. P. Saftig / PD Dr. M. Schwake, Biochemisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
06/2008 – 05/2011	Promotions-Stipendiat und Mitglied des Graduiertenkollegs 1459 „Sorting and Interactions Between Proteins of Subcellular Compartments“ AG Prof. Dr. P. Saftig / PD Dr. M. Schwake, Biochemisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
02/2008 – 05/2008	Praktikant bei der QIAGEN Hamburg GmbH in der Abteilung „Forschung und Entwicklung“ AG Dr. R. Söller
04/2007 – 01/2008	Diplomarbeit im Hauptfach Biochemie und Molekularbiologie angefertigt in der AG Prof. Dr. P. Saftig / PD Dr. M. Schwake am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
10/2003 – 01/2008	Studium der Biochemie und Molekularbiologie Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
07/2002 – 06/2003	Grundwehrdienst mit anschließendem freiwilligen Wehrdienst beim Marinefliegergeschwader 2, Tarp / Eggebek
06 / 2002	Abitur , Gymnasium Kronwerk Rendsburg

9.4 Publikationen und Poster

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

Blanz, J., **Groth, J.**, Zachos, C., Wehling, C., Saftig, P. and Schwake, M. (2010).

Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase.

Hum Mol Genet. 19(4), 563-572.

Poster:

Blanz, J., **Groth, J.**, Zachos, C., Wehling, C., Saftig, P. and Schwake, M.

Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase.

17th ESGLD Workshop. Bad Honnef, Germany. 10 – 13 September 2009.

Groth, J., Höfken, T., Saftig, P. and Schwake, M.

Stoichiometry of the β -glucocerebrosidase/lysosomal integral membrane protein type-2 complex.

Lysosomes in health and disease. Charles Darwin House, London, UK. 13 – 14 May 2010.

Groth, J., Höfken, T., Zachos, C., Saftig, P. and Schwake, M.

Stoichiometry of the β -glucocerebrosidase/lysosomal integral membrane protein type-2 complex.

1st International Symposium for PhD students on: Protein Trafficking in Health and Disease.

Hamburg, Germany, 26 – 28 May 2010.

9.5

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Paul Saftig

Herrn Prof. Dr. Axel Scheidig

Herrn PD Dr. Michael Schwake

Dem GRK1459 und der DFG

Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger

Herrn Dr. Sascha Jung

Frau Dr. Inken Lorenzen

Herrn Dr. Konrad Büssow und Frau Dr. Sonja Wilke

Herrn Kai Menke und Frau Felicitas Krohn

Bernd, Björn, Detlef & Thore

Femke und meinen Eltern

Vielen DANK!

9.6 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Johann Groth,

- dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist,
- dass abgesehen von der wissenschaftlichen Betreuung durch meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. P. Saftig und meinen Betreuer Herrn PD Dr. M. Schwake, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe,
- dass bei Inanspruchnahme fremder Hilfen diese aufgeführt ist,
- dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und diese entsprechend angegeben habe,
- dass die Dissertation weder ganz noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.
- dass Teilergebnisse der vorliegenden Abhandlung zur Veröffentlichung eingereicht wurden,
- dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde,
- dass ich für die mündliche Prüfung die Form der Disputation wähle.

Kiel, den 10. April 2012

Johann Groth